

**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK KULIT JERUK
MANIS (*Citrus sinensis*) SECARA PERORAL DAN
TOPIKAL TERHADAP EKSPRESI TNF- α DAN
KEPADATAN KOLAGEN DALAM PROSES
KESEMBUHAN LUKA INSISI PADA
TIKUS DIABETES MELLITUS**

SKRIPSI

**Oleh:
DWIYANA MARTA AFRIDA
135130100111044**



**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2018**

**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK KULIT JERUK
MANIS (*Citrus sinensis*) SECARA PERORAL DAN
TOPIKAL TERHADAP EKSPRESI TNF- α DAN
KEPADATAN KOLAGEN DALAM PROSES
KESEMBUHAN LUKA INSISI PADA
TIKUS DIABETES MELLITUS**

SKRIPSI

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

Oleh:
DWIYANA MARTA AFRIDA
135130100111044



**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2018**

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

Pengaruh Pemberian Ekstrak Kulit Jeruk Manis (*Citrus sinensis*) Secara Peroral dan Topikal terhadap Ekspresi TNF- α dan Kepadatan Kolagen dalam Proses Kesembuhan Luka Insisi pada Tikus Diabetes Mellitus

Oleh:

DWIYANA MARTA AFRIDA

135130100111044

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji
pada tanggal 10 Januari 2018
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

Pembimbing I

Pembimbing II

Prof. Dr. Aulanni'am, drh. DES

NIP. 19600903 198802 2 001

drh. Fajar Shodiq Permata, M.Biotech

NIP. 19870501 201504 1 001

Mengetahui,

Dekan Fakultas Kedokteran Hewan

Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya

Prof. Dr. Aulanni'am, drh. DES

NIP. 19600903 198802 2 001

LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Dwiyana Marta Afrida

NIM : 135130100111044

Program Studi : Kedokteran Hewan

Penulis Skripsi berjudul:

Pengaruh Pemberian Ekstrak Kulit Jeruk Manis (*Citrus sinensis*) Secara Peroral dan Topikal terhadap Ekspresi TNF- α dan Kepadatan Kolagen dalam Proses Kesembuhan Luka Insisi pada Tikus Diabetes Mellitus

Dengan ini menyatakan bahwa:

1. Isi dari skripsi yang saya buat adalah benar-benar karya saya sendiri dan tidak menjiplak karya orang lain, selain nama-nama yang termasuk di isi dan tertulis di daftar pustaka dalam skripsi ini.
2. Apabila dikemudian hari ternyata skripsi yang saya tulis terbukti hasil jiplakan, maka saya akan bersedia menanggung segala resiko yang akan saya terima.

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, Januari 2018

Yang menyatakan,

(Dwiyana Marta Afrida)

NIM. 135130100111044

Pengaruh Pemberian Ekstrak Kulit Jeruk Manis (*Citrus sinensis*) Secara Peroral dan Topikal terhadap Ekspresi TNF- α dan Kepadatan Kolagen dalam Proses Kesembuhan Luka Insisi pada Tikus Diabetes Mellitus

ABSTRAK

Diabetes Mellitus merupakan suatu keadaan dimana kadar gula dalam darah meningkat. Keadaan hiperglikemia akan memicu terbentuknya senyawa oksigen reaktif (ROS). Peningkatan ROS berperan penting dalam produksi mediator inflamasi salah satunya *Tumor Necrosis Factor-Alpha* (TNF- α). TNF- α dapat memicu aktivasi enzim MMP untuk mendegradasi komponen matriks ekstraseluler salah satunya kolagen. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui potensi kulit jeruk manis (*Citrus sinensis*) dalam membantu penyembuhan luka pada tikus diabetes. Tikus dibagi menjadi 5 kelompok: kontrol negatif, kontrol positif, terapi oral, terapi topikal, dan terapi kombinasi. Terapi oral diberikan dalam bentuk *effervescent*, terapi topikal diberikan dalam bentuk salep konsentrasi 5%, serta terapi kombinasi diberikan dalam *effervescent* dan salep. Tikus diabetes didapatkan dengan cara induksi MLD-STZ dengan dosis 20 mg/kg BB selama 5 hari kemudian dibuat luka insisi. Dosis oral yang digunakan adalah 500 mg/kg BB, sementara terapi topikal yang diberikan sebanyak 0,1 gram. Terapi diberikan sekali sehari selama 10 hari. Ekspresi TNF- α diamati menggunakan metode imunohistokimia, kemudian dianalisa secara kuantitatif dengan *one way* ANOVA dan dilanjutkan dengan uji *tukey*. Kepadatan kolagen diamati dengan pewarnaan *Masson's Trichrome* dan dianalisa secara kualitatif. Hasil penelitian menunjukkan pemberian terapi ekstrak kulit jeruk manis (*Citrus sinensis*) secara signifikan ($p < 0,05$) menurunkan ekspresi TNF- α dan meningkatkan sintesis kolagen. Penurunan tertinggi ekspresi TNF- α sebesar 47,06% dan sintesis kolagen terbaik terdapat pada kelompok terapi kombinasi. Kesimpulan dari penelitian ini adalah ekstrak kulit jeruk manis dapat digunakan sebagai terapi luka insisi diabetes dengan pemberian secara oral, topikal, dan kombinasi.

Kata kunci: kulit jeruk manis, diabetes mellitus, luka, TNF- α , kolagen.

**The Potency of Oral and Topical Administration of Sweet Orange Peel
(*Citrus sinensis*) Extract towards TNF- α Expression and Collagen Density on
Wound-healing Process in Diabetes Mellitus Rats Model**

ABSTRACT

Diabetes Mellitus is a condition in which blood glucose levels increase. Hyperglycemia condition could trigger the formation of reactive oxygen species (ROS). Increased ROS plays an important role in production of inflammatory mediators such as Tumor Necrosis Factor-Alpha (TNF- α). TNF- α could trigger MMP enzyme activation to degrade collagen one of extracellular matrix component. The aim of this research is to understand the potency of sweet orange peel (*Citrus sinensis*) on helping wound-healing process on diabetic rats. The rats were divided into 5 groups: negative control, positive control, oral treatment, topical treatment, and combination treatment. The oral therapy was given by effervescent, the topical therapy by 5% ointment, and the combination therapy by effervescent and ointment. The diabetic rats were induced by MLD-STZ with dose of 20 mg/kg BW for 5 days then an incision wound was made. The oral dosage given was 500 mg/kg body weight, while the topical was 0,1 grams. Therapy was given once daily for 10 days. TNF- α expression was observed using immunohistochemistry technique, and data was analyzed quantitatively with one way ANOVA and continued with tukey test. Collagen density was observed with Masson's Trichrome and analyzed qualitatively. The results showed that sweet orange peel (*Citrus sinensis*) extract significantly ($p < 0,05$) decrease level of TNF- α and increase collagen synthesis. The highest decrease of TNF- α expression was 47,06% and the best collagen synthesis was presented by the combination therapy group. The conclusion is sweet orange peel extract have potency for diabetic wound healing therapy by oral, topical, and combination administration.

Keywords: sweet orange peel, diabetes mellitus, wound, TNF- α , collagen

KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadirat Allah SWT yang telah memberikan segala nikmat dan hidayah-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan tugas akhir ini yang berjudul **“Pengaruh Pemberian Ekstrak Jeruk Manis (*Citrus sinensis*) Secara Peroral dan Topikal terhadap Ekspresi TNF- α dan Kepadatan Kolagen dalam Proses Kesembuhan Luka Insisi pada Tikus Diabetes Mellitus**”. Sholawat dan salam semoga tetap tercurah kepada Nabi Muhammad SAW.

Penulis mengucapkan terima kasih kepada pihak-pihak yang telah membantu dalam menyelesaikan skripsi ini, yaitu:

1. Prof. Dr. Aulanni'am, drh. DES selaku pembimbing I dan drh. Fajar Shodiq Permata, M. Biotech selaku pembimbing II yang telah banyak memberikan bimbingan, nasehat dan arahan kepada penulis.
2. drh. Wawid Purwatiningsih, M.Vet dan drh. Fidi Nur Aini E.P.D, M.Si selaku dosen penguji atas tanggapan dan saran yang diberikan.
3. Prof. Dr. Aulani'am, drh. DES selaku Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya (FKH UB).
4. Secara khusus penulis ingin mengucapkan terima kasih kepada Ayah dan Ibu tercinta serta keluarga besar yang telah banyak memberikan dukungan, doa dan pengorbanan baik secara moral maupun materi, sehingga penulis dapat menyelesaikan tugas akhir ini.
5. Serta penulis juga menyampaikan terima kasih kepada teman-teman seperjuangan dalam penelitian ini, yaitu Damar Alam, Ivana Aginta,

Giovanni Saputra, Fuad Nabil Qoys, dan Hazra Maulidina atas semangat, kerja sama dan motivasi yang diberikan.

6. Seluruh staf dan karyawan FKH UB, yang telah membantu proses administrasi dalam membuat tugas akhir.
7. Keluarga besar DEXA (2013-D) dan angkatan 2013 FKH UB yang telah memberikan semangat dan dukungan kepada penulis.
8. Kementrian Riset, Teknologi dan Pendidikan Tinggi yang telah mendanai penelitian ini dalam ajang Program Kreativitas Mahasiswa

Penulis berharap tugas akhir ini dapat diterima, sehingga dapat memberikan pengalaman, serta wawasan baru terhadap penulis. Penulis menyadari bahwa tugas akhir ini masih jauh dari kesempurnaan. Oleh karena itu, penulis memohon maaf atas kekurangan tersebut.

Malang, Januari 2018

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN SAMPUL.....	i
HALAMAN JUDUL	ii
LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI	iii
LEMBAR PERNYATAAN	iv
ABSTRAK	v
KATA PENGANTAR.....	vii
DAFTAR ISI.....	ix
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR ISTILAH DAN SINGKATAN	xiv
DAFTAR LAMPIRAN	xv
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Batasan Masalah.....	4
1.4 Tujuan Penelitian.....	5
1.5 Manfaat Penelitian.....	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	6
2.1 Diabetes Mellitus.....	6
2.1.1 Definisi	6
2.1.2 Etiologi dan Patomekanisme	7
2.2 Hewan Coba	9
2.2.1 Streptozotocin.....	11
2.2.2 Gangguan Kesembuhan Luka pada Kasus DM.....	13
2.2.3 Fase Kesembuhan Luka.....	14
2.2.4 Kulit.....	17
2.3 Kulit Jeruk Manis	19
2.4 Terapi dalam Sediaan Oral	21

2.5 Terapi dalam Sediaan Topikal.....	23
2.6 <i>Tumor Necrosis Factor-Alpha</i> (TNF- α).....	24
2.7 Kolagen dalam Penyembuhan Luka.....	24
BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN	27
3.1 Kerangka Konseptual	27
3.2 Hipotesa Penelitian.....	30
BAB 4 METODE PENELITIAN.....	31
4.1 Waktu dan Tempat Peneltian	31
4.2 Alat dan Bahan Penelitian	31
4.2.1 Alat Penelitian	31
4.2.2 Bahan Penelitian	32
4.3 Tahapan Penelitian	32
4.3.1 Rancangan Penelitian	32
4.3.2 Sampel Penelitian	33
4.3.3 Variabel Penelitian	34
4.4 Prosedur Kerja.....	35
4.4.1 Persiapan Hewan Coba.....	35
4.4.2 Ekstraksi Kulit Jeruk Manis	35
4.4.3 Pembuatan Sediaan Effervescent.....	36
4.4.4 Pembuatan Sediaan Salep.....	36
4.4.5 Induksi Diabetes Mellitus pada Hewan Coba.....	36
4.4.6 Pembuatan Insisi.....	37
4.4.7 Pemberian Terapi Ekstrak Kulit Jeruk Manis.....	37
4.4.8 Eutanasi dan Pengambilan Jaringan Kulit	37
4.4.9 Pembuatan Preparat Histologi	38
4.4.10 Pewarnaan Kolagen dengan <i>Masson's Trichrome</i>	39
4.4.11 Ekspresi TNF- α dengan Imunohistokimia.....	40
4.4.12 Analisa Data	42
BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN.....	43
5.1 Pengaruh Pemberian Ekstrak Kulit Jeruk Manis terhadap Ekspresi TNF- α pada Penyembuhan Luka Insisi Tikus Model Diabetes	44

5.2 Pengaruh Pemberian Ekstrak Kulit Jeruk Manis terhadap Kepadatan Kolagen pada Penyembuhan Luka Insisi Tikus Model Diabetes....	52
BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN	57
DAFTAR PUSTAKA	58
LAMPIRAN.....	63



DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1 Senyawa penyusun Streptozotocin.....	12
2.2 Struktur Kulit	17
2.3 Bagian-bagian buah jeruk manis.....	20
5.1 Gambaran makroskopis kulit tikus pasca 10 hari terapi.....	43
5.2 Ekspresi TNF- α dengan pewarnaan IHK	46
5.3 Gambaran histopatologi kolagen dengan pewarnaan MT	53



DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
4.1 Rancangan Kelompok Penelitian	33
5.1 Rata-rata Hasil Uji BNJ Ekspresi TNF- α pada kelompok tikus	48



DAFTAR ISTILAH DAN SINGKATAN

Simbol/ Singkatan	Keterangan
%	: persen
ADP	: <i>Adenosine Diphosphat</i>
AGE	: <i>Advanced Glycation End-Product</i>
ANOVA	: <i>Analysis of Variance</i>
ATP	: <i>Adenosine Triphospat</i>
BB	: Berat Badan
BSA	: <i>Bovine Serum Albumin</i>
Cm	: Centimeter
dL	: Desiliter
DM	: Diabetes Mellitus
DNA	: <i>Deoxyribonucleic Acid</i>
ECM	: <i>Extracellular Matrix</i>
GLUT2	: <i>Glucose Transporter 2</i>
IHK	: Imunohistokimia
Kg	: Kilogram
L	: Liter
Mg	: Miligram
MLD	: <i>Multiple Low Dose</i>
MMP	: <i>Matrix Metalloproteinase</i>
NAD ⁺	: <i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide</i>
NBF	: <i>Netral Buffer Formalin</i>
NO	: Nitrit Oksida
PBS	: <i>Phosphate Buffer Saline</i>
pH	: <i>Potential of Hydrogen</i>
RAL	: Rancangan Acak Lengkap
ROS	: <i>Reactive Oxygen Species</i>
SA-HRP	: <i>Strep Avidin Horse Radish Peroxidase</i>
STZ	: Streptozotocin
TGF	: <i>Transforming Growth Factor</i>
TNF- α	: <i>Tumor Necrosis Factor-Alpha</i>

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Kerangka Operasional	63
2. Pembuatan Ekstrak Kulit Jeruk Manis	64
3. Perhitungan Dosis Induksi STZ	65
4. Perhitungan Pembuatan <i>Effervescent</i>	66
5. Pembuatan Preparat Histopatologi	67
6. Pewarnaan Kolagen dengan <i>Masson's Trichrome</i>	68
7. Ekspresi TNF- α dengan Imunohistokimia	69
8. Data Ekspresi TNF- α (IHK) (%)	70
9. Hasil Uji Statistika IHK terhadap Ekspresi TNF- α	71
10. Sertifikat Laik Etik	74
11. Surat Ekstraksi Kulit Jeruk Manis	75
12. Surat Determinasi Kulit Jeruk Manis	76
13. Surat Uji Fitokimia	77
14. Dokumentasi Kegiatan	78

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Diabetes Mellitus (DM) adalah suatu keadaan dimana kadar gula dalam darah meningkat dan di dalam urin ditemukan gula. DM mendapat gelar "*The silent killer*" karena komplikasi yang dapat ditimbulkannya dan hingga kini masih belum tuntas penanganannya. Komplikasi akut yang disebabkan oleh terganggunya proses metabolisme karbohidrat sehingga menyebabkan kadar gula darah tinggi atau sangat rendah dan dapat timbul koma diabetikum. Apabila tidak segera ditolong dapat menimbulkan kematian. Komplikasi kronis (menahun) disebabkan timbulnya kerusakan pembuluh darah besar dan kecil pada organ tubuh serta anafilaksis (Dalimunthe, 2004).

Diabetes mellitus dibagi menjadi 2 kategori utama berdasarkan sekresi insulin endogen untuk mencegah munculnya ketoasidosis, yaitu (1) Diabetes mellitus tergantung insulin atau tipe I, dan (2) Diabetes mellitus tidak tergantung insulin atau tipe II. DM tipe I diperantarai oleh degenerasi sel β Langerhans pankreas akibat infeksi virus, pemberian senyawa toksin, diabetogenetik (streptozotocin, aloksan), atau secara genetik yang mengakibatkan produksi insulin sangat rendah atau berhenti sama sekali (Nugroho, 2006).

Menurut *International Diabetic Federation* (IDF, 2015) tingkat prevalensi global penderita DM pada tahun 2014 sebesar 8,3% dari keseluruhan penduduk di dunia dan mengalami peningkatan pada tahun 2015 menjadi 387 juta kasus. Indonesia merupakan negara menempati urutan ke 7 dengan penderita DM

sejumlah 8,5 juta penderita setelah Cina, India, Amerika Serikat, Brazil, Rusia, dan Mexico. Kejadian kasus diabetes mellitus pada hewan khususnya pada anjing dan kucing dari 1 dalam 100 ekor (Nelson, 2010) dan 1 dalam 500 (Reusch, 2010), dan telah terjadi peningkatan tiga kali lipat selama 30 tahun terakhir untuk jumlah anjing yang telah didiagnosis menderita penyakit ini.

Penyakit DM berpengaruh besar terhadap kesembuhan luka. Tingginya kadar gula dalam darah akan menghambat leukosit melakukan fagositosis sehingga rentan terhadap adanya infeksi. Keadaan hiperglikemia akan memicu autooksidasi glukosa, glikasi protein dan aktivasi jalur metabolisme poliol yang selanjutnya mempercepat terbentuknya senyawa oksigen reaktif (ROS) (Rahmadkk, 2014).

Peningkatan ROS akan memberikan efek lamanya fase inflamasi pada penyembuhan luka, yaitu fase munculnya sitokin proinflamasi seperti *Tumor Necrosis Factor- α* (TNF- α) (Puspitasari dkk, 2011). TNF- α merupakan salah satu sitokin yang memiliki sifat proinflamasi, berperan penting dalam imunitas *innate* dan adaptif, proliferasi sel, maupun proses apoptosis. Peningkatan kadar TNF- α akan menyebabkan stress oksidatif pada pembuluh darah. TNF- α dapat memicu aktivasi enzim *matrixmetalloproteinase* (MMP), suatu enzim yang berfungsi untuk degradasi komponen matriks ekstraseluler (ECM) (Lakhanpal, 2007). Kolagen secara normal ditemukan menghubungkan jaringan, melintasi luka dengan bermacam-macam sel mediator. Kolagen adalah sel yang paling penting pada fase inflamasi dan fase proliferasi. Substansi ini membangun kembali pertumbuhan jaringan (Afriyanti dkk, 2014).

Penggunaan obat pada luka bertujuan untuk mempercepat proses kesembuhan. Indonesia memiliki 25.000-30.000 jenis tanaman dan sekitar 6.000 diantaranya memiliki potensi untuk dijadikan tanaman obat (Kardono dkk., 2003). Pengobatan luka yang sering dilakukan adalah penggunaan obat kimia seperti povidone iodine, namun penggunaan obat ini memiliki beberapa efek samping antara lain yaitu timbulnya iritasi kulit. Pengobatan alternatif pada luka yang berkembang hingga saat ini adalah pemberian obat herbal alami sebagai Pereda rasa nyeri dan inflamasi (Evaria dan Rince, 2007).

Jeruk manis dalam Bahasa inggris disebut *sweet orange* dengan nama ilmiah Citrus sinensis. Kandungan senyawa dalam kulit buah jeruk antara lain triterpene, flavonoid, asam askorbat, vitamin E, vitamin A, dan polifenol. Kandungan flavonoid diduga memiliki aktivitas antidiabetes. Aksi flavonoid sebagai antidiabetes diduga dengan meregenerasi kerusakan sel beta pankreas dan merangsang sel beta pankreas untuk memproduksi insulin (Muhtadi, *et al.* 2015). Flavonoid juga memiliki efek dalam meningkatkan penyembuhan luka dengan mempercepat laju epitelisasi melalui induksi produksi *transforming growth factor*-beta (TGF- β) (Kartikaningtyas, dkk. 2015).

Berdasarkan latar belakang yang telah disebutkan, maka perlu dilakukan penelitian dari efek antidiabetes kulit jeruk manis untuk membantu proses penyembuhan luka diabetes mellitus yang diberikan secara peroral dan topikal. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh kulit jeruk manis terhadap kesembuhan luka khususnya pada Kadar TNF- α yang berperan pada fase inflamasi serta kepadatan kolagen yang sebagai indikator kesembuhan luka.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah disebutkan, terdapat beberapa rumusan masalah yang didapat antara lain yaitu:

1. Apakah pemberian ekstrak kulit jeruk manis (*Citrus sinensis*) secara oral dan topikal dapat mempengaruhi penurunan ekspresi TNF- α pada luka insisi kulit tikus (*Rattus Norvegicus*) model diabetes mellitus.
2. Apakah pemberian ekstrak kulit jeruk manis (*Citrus sinensis*) secara oral dan topikal dapat berpengaruh terhadap kepadatan kolagen pada luka insisi kulit tikus (*Rattus norvegicus*) model diabetes mellitus.

1.3 Batasan Masalah

Berdasarkan rumusan masalah yang sudah disebutkan di atas, maka penelitian ini dibatasi pada:

1. Hewan Model yang digunakan adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan berumur 2 bulan dengan berat badan 150-200 gram. Penggunaan tikus telah mendapatkan sertifikat Laik Etik dari Komisi Etik Penelitian Universitas Brawijaya No: 761-KEP-UB.
2. Tikus model diabetes diperoleh dengan cara induksi Streptozotocin secara intraperitoneal dengan dosis 20 mg/kg BB selama 5 hari berturut-turut (Aulanni'am, 2005) diinkubasi selama 14 hari dan penentuan kondisi diabetes diukur menggunakan glukometer digital dan dinyatakan diabetes jika glukosa darah >200 mg/dL.
3. Pemberian terapi ekstrak kulit jeruk manis (*Citrus sinensis*) dilakukan secara oral dalam bentuk serbuk *effervescent* dengan dosis 500 mg/kg BB

serta secara topikal dalam bentuk salep konsentrasi 5%. Pemberian terapi dilakukan sekali sehari selama 10 hari pasca insisi.

4. Variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah ekspresi TNF- α dan kepadatan kolagen. Pengamatan ekspresi TNF- α menggunakan metode imunohistokimia dan pengamatan kepadatan kolagen menggunakan pewarnaan *Masson's Trichrome*.

1.4 Tujuan Penelitian

Berdasarkan latar belakang yang telah disebutkan, terdapat beberapa tujuan dari penelitian ini antara lain yaitu:

1. Mengetahui pengaruh pemberian ekstrak kulit jeruk manis (*Citrus sinensis*) secara oral dan topikal terhadap ekspresi TNF- α pada luka insisi kulit tikus (*Rattus norvegicus*) model diabetes mellitus.
2. Mengetahui pengaruh pemberian ekstrak kulit jeruk manis (*Citrus sinensis*) secara oral dan topikal terhadap kepadatan kolagen pada luka insisi kulit tikus (*Rattus norvegicus*) model diabetes mellitus.

1.5 Manfaat Penelitian

Beberapa manfaat dalam penelitian ini yaitu sebagai bahan informasi penelitian selanjutnya untuk membuktikan pengaruh pemberian ekstrak kulit jeruk manis untuk membantu proses penyembuhan luka pada pasien diabetes mellitus. Selain itu pemberian terapi ekstrak kulit jeruk manis diharapkan dapat menjadi alternatif pengobatan untuk luka khususnya pada pasien diabetes mellitus.

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Diabetes Mellitus

2.1.1 Definisi

Diabetes mellitus (DM) didefinisikan sebagai suatu penyakit atau gangguan metabolisme yang ditandai dengan tingginya kadar gula darah disertai dengan gangguan metabolisme karbohidrat, lipid dan protein sebagai akibat insufisiensi fungsi insulin. Insufisiensi insulin dapat disebabkan oleh gangguan atau defisiensi produksi insulin oleh sel-sel beta Langerhans kelenjar pankreas atau disebabkan kurang responsifnya sel-sel tubuh terhadap insulin (Ditjen Bina Farmasi dan Alkes, 2005).

Diabetes adalah suatu penyakit dimana metabolisme glukosa tidak normal, suatu risiko komplikasi spesifik perkembangan mikrovaskuler dan ditandai dengan adanya peningkatan komplikasi perkembangan makrovaskuler. Secara umum, ketiga elemen diatas telah digunakan untuk menemukan diagnosis atau penyembuhan diabetes (Mogensen, 2007).

Pada beberapa populasi tetapi bukan semuanya, definisi diabetes oleh distribusi glukosa adalah pendistribusian glukosa ke seluruh jaringan dimana berbeda distribusi glukosa pada setiap individual dengan atau tanpa batas diabetes. Selain itu distribusi glukosa juga dapat menjadi parameter untuk penyakit diabetes atau dengan kata lain, nilai definisi diagnosis untuk diabetes didasarkan pada nilai distribusi glukosa pada tingkat populasi bukan sering atau tidaknya berolahraga. Besarnya komplikasi mikrovaskuler pada retina dan ginjal spesifik menuju ke

diabetes. Selain itu terjadi komplikasi makrovaskuler dapat menyebabkan kematian pada penderita diabetes. Hal ini ditunjukkan bahwa nilai glukosa yang tidak normal seharusnya ditemukan sebagai peningkatan cepat dari nilai glukosa, yang mana diapresiasi dengan peningkatan risiko penyakit kardiovaskuler (Mogensen, 2007).

2.1.2 Etiologi dan Patomekanisme

Diabetes mellitus dibagi menjadi 2 kategori utama berdasarkan sekresi insulin endogen untuk mencegah munculnya ketoasidosis, yaitu (1) Diabetes mellitus tergantung insulin (IDDM= *Insulin Dependent Diabetes Mellitus*) atau tipe I, dan (2) Diabetes mellitus tidak tergantung insulin (NIDDM= non-insulin dependent diabetes mellitus) atau tipe II (Nugroho, 2006).

Diabetes mellitus (DM) tipe I diperantarai oleh degenerasi sel β Langerhans pankreas akibat infeksi virus, pemberian senyawa toksin, diabetogenik (streptozotosin, aloksan), atau secara genetik yang mengakibatkan produksi insulin sangat rendah atau berhenti sama sekali. Hal tersebut mengakibatkan penurunan pemasukan glukosa dalam otot dan jaringan adiposa. Secara patofisiologi, penyakit ini terjadi lambat dan membutuhkan waktu yang bertahun-tahun, biasanya terjadi sejak anak-anak atau awal remaja. Penurunan berat badan merupakan ciri khas dari penderita DM I yang tidak terkontrol. Gejala yang sering mengiringi DM I yaitu poliuria, polidipsia, dan polifagia. Peningkatan volume urin terjadi disebabkan oleh diuresis osmotik (akibat peningkatan kadar glukosa darah atau hiperglikemik) dan benda-benda keton dalam urin. Lebih lanjut, diuresis osmotik tersebut akan mengakibatkan kondisi dehidrasi, kelaparan

dan *shock*. Gejala haus dan lapar merupakan akibat dari kehilangan cairan dan ketidakmampuan tubuh menggunakan nutrisi (Nugroho, 2006).

Pada DM I, kadar glukosa darah sangat tinggi, tetapi tubuh tidak dapat memanfaatkannya secara optimal untuk membentuk energi. Oleh karena itu, energi diperoleh melalui peningkatan katabolisme protein dan lemak. Seiring dengan kondisi tersebut, terjadi perangsangan lipolisis serta peningkatan kadar asam lemak bebas dan gliserol darah. Dalam hal ini terjadi peningkatan produksi asetil-KoA oleh hati, yang pada gilirannya diubah menjadi asam β -hidroksibutirat atau mengalami dekarboksilasi menjadi aseton. Pada kondisi normal, konsentrasi benda-benda keton relatif rendah karena insulin dapat menstimulasi sintesis asam lemak dan menghambat lipolisis. Hanya dibutuhkan kadar insulin yang kecil untuk menghambat lipolisis (Nugroho, 2006).

Pada kondisi DM tipe II, insulin masih cukup untuk mencegah terjadinya benda-benda keton sehingga jarang dijumpai ketosis. Namun demikian, koma hiperosmolar non-ketotik dapat terjadi. DM II tersebut cenderung terjadi pada individu usia lanjut dan biasanya didahului oleh keadaan sakit atau stress yang membutuhkan kadar insulin tinggi. Pada DM II, kehadiran insulin tidak cukup untuk mencegah glukosuria. Seiring dengan itu, terjadi kehilangan cairan dan elektrolit tubuh yang diikuti dengan dehidrasi berat. Lebih lanjut, terjadi penurunan ekskresi glukosa dan pada akhirnya menghasilkan peningkatan osmolaritas serum (hiperosmolaritas) dan glukosa darah (hiperglikemik) (Nugroho, 2006).

Secara patofisiologi, DM tipe II disebabkan karena dua hal yaitu (1) penurunan respon jaringan perifer terhadap insulin, peristiwa tersebut dinamakan resistensi insulin, dan (2) Penurunan kemampuan sel β pankreas untuk mensekresi insulin sebagai respon terhadap beban glukosa. Sebagian besar DM tipe II diawali dengan kegemukan karena kelebihan makan. Sebagai kompensasi, sel β pankreas merespon dengan mensekresi insulin lebih banyak sehingga kadar insulin meningkat (hyperinsulinemia). Konsentrasi insulin yang tinggi mengakibatkan reseptor insulin berupaya melakukan pengaturan sendiri (*self regulation*) dengan menurunkan jumlah reseptor atau *down regulation*. Hal ini membawa dampak pada penurunan respon reseptornya dan lebih lanjut mengakibatkan terjadinya resistensi insulin. Di lain pihak, kondisi hiperinsulinemia juga dapat mengakibatkan desensitisasi reseptor insulin pada tahap postreseptor, yaitu penurunan aktivasi kinase reseptor, translokasi *glucose transporter* dan aktivasi *glycogen synthase*. Kejadian ini mengakibatkan terjadinya resistensi insulin. Dua kejadian tersebut terjadi pada permulaan proses terjadinya DM tipe II (Nugroho, 2006).

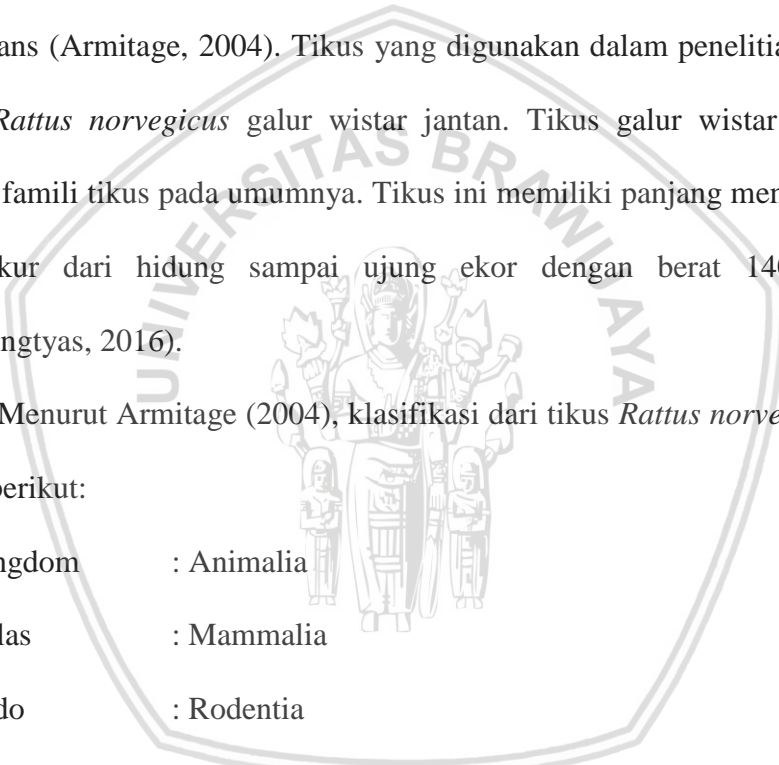
2.2 Hewan Coba Tikus (*Rattus norvegicus*) Model DM

Tikus (*Rattus norvegicus*) digunakan sebagai hewan model karena memiliki kemiripan fungsi dan bentuk organ serta proses biokimia dan biofisik dengan mamalia sehingga penelitian yang dilakukan dapat diaplikasikan pada anjing dan kucing (Hedrich, 2006). Selain itu tikus putih juga memiliki homogenitas metabolik yang mirip manusia. Tikus putih memiliki organ dan fisiologi sistemik yang sama, serta memiliki gen yang mirip dengan manusia.

Tikus putih juga memiliki kemiripan yang baik bagi patogenitas suatu penyakit. Kemiripan inilah yang menjadi salah satu alasan mengapa tikus putih digunakan dalam meneliti patogenitas penyakit maupun proses penuaan pada manusia (Olayaki *et al.*, 2008).

Terdapat tiga galur atau varietas tikus *Rattus norvegicus* yang biasa digunakan sebagai hewan percobaan yaitu galur Sprague Dawley, Wistar, dan Long Evans (Armitage, 2004). Tikus yang digunakan dalam penelitian ini adalah spesies *Rattus norvegicus* galur wistar jantan. Tikus galur wistar lebih besar daripada famili tikus pada umumnya. Tikus ini memiliki panjang mencapai 40 cm, jika diukur dari hidung sampai ujung ekor dengan berat 140-500 gram (Purwaningtyas, 2016).

Menurut Armitage (2004), klasifikasi dari tikus *Rattus norvegicus* adalah sebagai berikut:



Kingdom	: Animalia
Kelas	: Mammalia
Ordo	: Rodentia
Familia	: Muridae
Genus	: Rattus
Spesies	: <i>Rattus norvegicus</i>

Pembuatan hewan model diabetes mellitus pertama kali dilakukan secara sederhana yaitu dengan cara pengambilan organ pankreas secara menyeluruh atau sebagian yang dikenal dengan nama pankreotomi namun metode tersebut sekarang sudah jarang digunakan karena kondisi patologi yang dihasilkan tidak

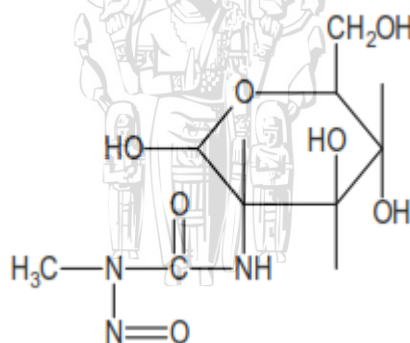
secara kuat mencerminkan kondisi patologi pada manusia (Fernandez *et al.*, 2006). Selain metode pankreatomi dapat juga digunakan agen diabetogenik untuk menghasilkan kondisi hiperglikemia pada hewan coba yang merupakan tanda dari penyakit diabetes mellitus. Beberapa agen diabetogenik yang dapat digunakan yaitu Streptozotocin, Alloxan, Vacor, Dithizone, 8-hidroksikuinolon (Ress and Alcolado, 2005).

2.2.1 Streptozotocin

Streptozotocin (STZ) atau 2-deoksi-2-[3-(metil-3-nitrosoureido)-D-glukopiranosose] diperoleh dari *Streptomyces achromogenes* dapat digunakan untuk menginduksi baik DM tipe 1 maupun tipe 2 pada hewan uji. Struktur kimia streptozotocin dapat dilihat pada gambar. Dosis yang digunakan untuk menginduksi DM tipe 1 untuk intravena adalah 40-60 mg/kg, sedangkan dosis intraperitoneal adalah lebih dari 40 mg/kg BB. STZ juga dapat diberikan secara berulang, untuk menginduksi DM tipe 1 yang diperantarai aktivasi sistem imun. Untuk menginduksi DM tipe 2, STZ diberikan intravena atau intraperitoneal dengan dosis 100 mg/kg BB pada tikus yang berumur 2 hari kelahiran, pada 8-10 minggu tikus tersebut mengalami gangguan respon terhadap glukosa dan sensitivitas sel β terhadap glukosa. Di lain pihak, sel α dan δ tidak dipengaruhi secara signifikan oleh pemberian streptozotocin pada neonatal tersebut sehingga tidak membawa dampak pada perubahan glukagon dan somatostatin. Patofisiologis tersebut identik pada Dm tipe 2 (Szkudelski, 2001).

STZ menembus sel β Langerhans melalui transporter glukosa GLUT 2. Aksi STZ intraseluler menghasilkan perubahan DNA sel β pankreas. Alkilasi

DNA oleh STZ melalui gugus nitrosoarea mengakibatkan kerusakan pada sel δ pankreas. STZ merupakan donor NO (*nitric oxide*) yang mempunyai kontribusi terhadap kerusakan sel tersebut melalui peningkatan aktivitas guanilil siklase dan pembentukan cGMP. NO dihasilkan sewaktu STZ mengalami metabolisme dalam sel. Selain itu, STZ juga mampu membangkitkan oksigen reaktif yang mempunyai peran tinggi dalam kerusakan sel β pankreas. Pembentukan anion superoksida karena aksi STZ dalam mitokondria dan peningkatan aktivitas xantin oksidase. Dalam hal ini, STZ menghambat siklus krebs dan menurunkan konsumsi oksigen mitokondria. Produksi ATP mitokondria yang terbatas selanjutnya mengakibatkan pengurangan secara drastic nukleotida sel δ pankreas (Szkudelski, 2001).



Gambar 2.1 Senyawa penyusun Streptozotocin (Sumber: Szkudelski, 2001)

Peningkatan defosforilasi ATP akan memacu peningkatan substrat untuk enzim xantin oksidase (sel β pankreas mempunyai aktivitas tinggi terhadap enzim ini), lebih lanjut meningkatkan produksi asam urat. Xantin oksidase mengkatalis reaksi pembentukan anion superoksida aktif. Dari pembangkitan anion superoksida, terbentuk hidrogen peroksida dan radikal superoksida. NO dan oksigen reaktif tersebut adalah penyebab utama kerusakan sel β pankreas (Nugroho, 2006).

2.2.2 Gangguan Kesembuhan Luka pada Kasus Diabetes Mellitus

Penyakit neuropati dan vaskular adalah utama yang berkontribusi terjadinya luka. Pada pasien dengan diabetik, sering kali mengalami gangguan pada sirkulasi. Gangguan ini berhubungan dengan gangguan sensasi saraf terutama pada bagian tubuh perifer atau yang dikenal dengan “*diabetic peripheral neuropathy*” (Tanenberg, 2011). Efek sirkulasi inilah yang menyebabkan kerusakan pada saraf. Hal ini terkait dengan diabetik neuropati yang berdampak pada sistem saraf autonomi, yang mengontrol fungsi otot-otot, kelenjar dan organ *visceral*. Dengan adanya gangguan pada saraf autonomi menyebabkan terjadinya perubahan tonus otot yang menyebabkan abnormalnya aliran darah. Dengan demikian kebutuhan akan nutrisi dan oksigen maupun pemberian antibiotik tidak mencukupi atau tidak mencapai jaringan perifer, dan atau untuk kebutuhan metabolisme pada lokasi tersebut. Efek pada neuropati autonomi ini akan menyebabkan kulit menjadi kering, anhidrosis, yang memudahkan kulit menjadi rusak dan luka yang sukar sembuh, dan dapat menimbulkan infeksi dan meningkatkan risiko untuk terjadinya gangren. Dampak lain adalah karena adanya neuropati parifer yang mempengaruhi pada saraf sensori dan sistem motor yang menyebabkan hilangnya sensasi rasa tekanan, nyeri, dan perubahan temperatur. Hilangnya sensasi nyeri, suhu, dan tekanan yang biasanya terjadi pada kaki juga menjadi faktor risiko yang memicu terjadinya luka, sehingga berisiko tinggi infeksi dan terjadinya amputasi (Suriadi, 2004; Tanenberg, 2011).

Infeksi pada penderita DM terjadi karena kondisi hiperglikemia merusak respon imunologi, hal ini menyebabkan leukosit gagal melawan patogen yang

masuk, selain itu iskemia menyebabkan penurunan suplai darah yang menyebabkan antibiotik juga tidak efektif sampai pada luka (Suriadi. 2004). Lobmann *et al.* (2005), menerangkan hubungan gangguan fungsi sel, ketidakseimbangan inflamasi, protease, sitokin, dan faktor pertumbuhan. Dijelaskan bahwa pada kaki diabetes terjadi peningkatan apoptosis fibroblas, penurunan proliferasi sel fibroblas, dan reaksi inflamasi memanjang, terbukti dengan adanya neutrofil granulosit dalam jumlah besar di dalam luka. Neutrofil granulosit mensekresi sitokin proinflamasi terutama TNF- α dan interleukin-1 β (IL-1 β). Kedua sitokin ini merangsang sintesa *matrix metalloproteinase* (MMP), menyebabkan degradasi matrik protein dan faktor pertumbuhan sehingga penyembuhan luka menjadi terputus dan tidak terkoordinasi.

2.2.3 Fase Kesembuhan Luka

Luka adalah diskontinuitas jaringan yang disebabkan oleh trauma dari luar. Penyembuhan luka adalah proses tubuh untuk memperbaiki kerusakan jaringan agar dapat berfungsi kembali. Tubuh berusaha untuk menormalkan kembali semua kondisi abnormal akibat luka dengan proses penyembuhan. Respon tubuh apabila integritas kulit mengalami kerusakan berupa fase yang saling tumpang tindih, tetapi secara biologis dapat menghilangkan jaringan nonvital dan mencegah infeksi bakteri invasif. Kemudian, terjadi fase proliferasi dimana terjadi keseimbangan antara pembentukan jaringan parut dan regenerasi jaringan. Pada fase yang terakhir, terjadi fase remodeling yang bertujuan untuk memaksimalkan kekuatan dan integritas struktural dari luka (Lorentz dan Longaker, 2006).

1. Fase Inflamasi

Fase inflamasi berlangsung sejak terjadinya luka sampai kira-kira hari kelima, dan menjamin terjadinya homeostasis, penghilangan jaringan yang non vital dan mencegah terjadinya invasif oleh mikroba patogen. Pembuluh darah yang terputus pada luka akan menyebabkan perdarahan dan tubuh akan berusaha menghentikannya dengan vasokonstriksi, pengerutan ujung pembuluh yang putus (retraksi) dan reaksi hemstasis. Hemostasis terjadi karena trombosit yang keluar dari pembuluh darah saling melengket, dan bersama jala fibrin yang terbentuk, membekukan darah yang keluar dari pembuluh darah (Gurtner, 2007).

Berbagai mediator inflamasi yakni prostaglandin, interleukin-1 (IL-1), *tumor necrosis factor* (TNF), C5a, TGF- β dan produk degradasi bakteri seperti lipopolisakarida (LPS) akan menarik sel neutrofil sehingga menginfiltrasi matriks fibrin dan mengisi kavitas luka. Migrasi neutrofil ke luka juga dimungkinkan karena peningkatan permeabilitas kapiler akibat terlepasnya serotonin dan histamin oleh sel mast dan jaringan kulit. Neutrofil pada umumnya akan ditemukan pada 2 hari pertama dan berperan penting untuk memfagositosis jaringan mati dan mencegah infeksi. Keberadaan neutrofil yang berkepanjangan merupakan penyebab utama terjadinya konversi dari luka akut menjadi luka kronis yang tak kunjung sembuh (Gurtner, 2007).

2. Fase Proliferasi

Fase proliferasi disebut juga fase fibroplasia karena yang menonjol adalah fase proliferasi fibroblas yang berlangsung mulai hari ke-4 hingga hari ke-21 pasca trauma. Pada fase ini matriks fibrin yang didominasi oleh platelet dan

makrofag secara gradual digantikan oleh jaringan granulasi yang tersusun dari kumpulan fibroblas, makrofag, dan sel endotel yang membentuk matriks ekstraseluler dan neovaskular. Fibroblast berasal dari sel mesenkim yang belum terdiferensiasi, menghasilkan mukopolisakarida, asam aminoglisin, dan prolin yang merupakan bahan dasar kolagen serat yang akan mempertautkan tepi luka (Gurtner, 2007).

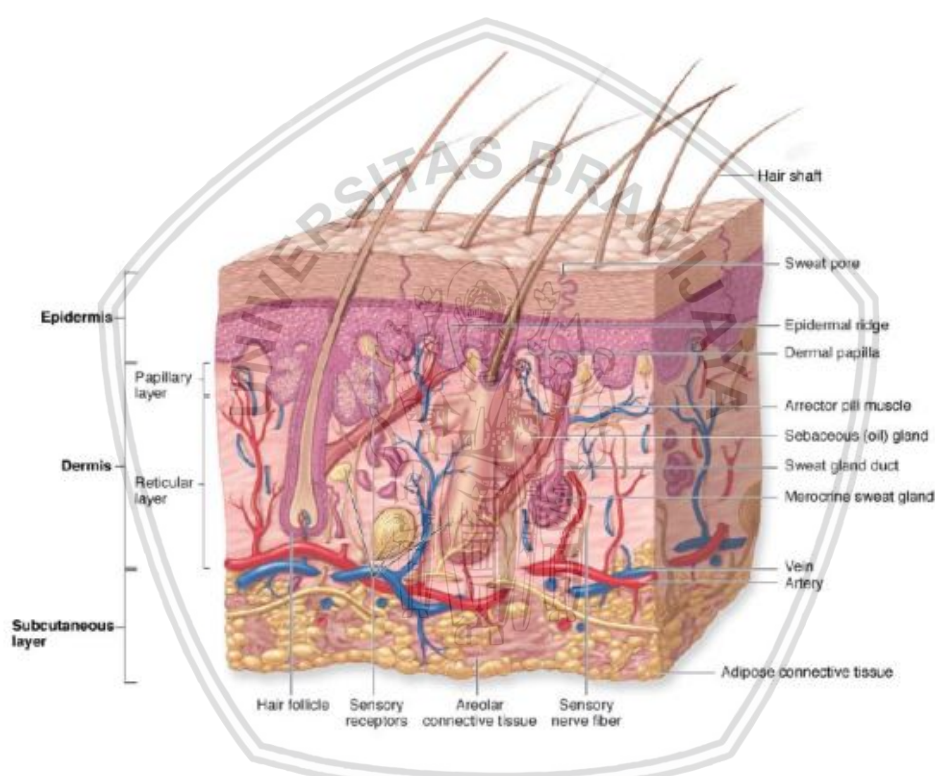
Pada fase fibroplasia ini, luka dipenuhi oleh sel radang, fibroblast, dan kolagen, membentuk jaringan berwarna kemerahan dengan permukaan berbenjol halus yang disebut jaringan granulasi. Epitel tepi luka yang terdiri atas sel basal terlepas dari dasarnya dan berpindah mengisi permukaan luka. Tempatnya kemudian diisi oleh sel baru yang terbentuk dari proses mitosis. Proses migrasi hanya terjadi ke arah yang lebih rendah atau datar. Proses ini baru berhenti setelah epitel saling menyentuh dan menutup permukaan luka. Pada saat permukaan luka sudah tertutup, proses fibroplasia dengan pembentukan jaringan granulasi juga akan terhenti dan mulailah proses pematangan dalam fase penyudahan (Gurtner, 2007).

3. Fase *Remodelling*

Fase *remodelling* merupakan fase penyudahan dari penyembuhan luka dan merupakan fase terlama yang berlangsung dari hari ke-21 dan bisa sampai 1 tahun. Fase ini dimulai segera setelah kavitas luka terisi oleh jaringan granulasi dan proses reepitelisasi usai. Tubuh berusaha menormalkan kembali semua yang menjadi abnormal karena proses penyembuhan. Edema dan sel radang diserap, sel muda menjadi matang, kapiler baru menutup dan diserap kembali, kolagen yang

berlebih diserap dan sisanya sesuai dengan regangan yang ada. Selama proses ini dihasilkan jaringan parut yang pucat, tipis dan lemas, serta mudah digerakkan dari dasar. Terlihat pengerutan maksimal pada luka. Pada akhir fase ini, perupaan kulit mampu menahan regangan kira-kira 80% kemampuan kulit normal. Hal ini tercapai kira-kira 3-6 bulan setelah penyembuhan (Gurtner, 2007).

2.2.4 Kulit



Gambar 2.2 Struktur Kulit (Sumber: Kalangi, 2013)

Kulit terdiri atas 2 lapisan utama yaitu epidermis dan dermis. Epidermis merupakan jaringan epitel yang berasal dari ektoderm, sedangkan dermis berupa jaringan ikat agak padat yang berasal dari mesoderm. Di bawah dermis terdapat selapis jaringan ikat longgar yaitu hipodermis, yang pada beberapa tempat terutama terdiri dari jaringan lemak (Kalangi, 2013). Secara fungsional kulit

melindungi organ di bawahnya terhadap kerusakan mekanik, bahan beracun dan rangsangan penyinaran, menghasilkan peluh dan minyak, bekerja sebagai organ sensori, mengatur suhu tubuh, mengeluarkan vitamin D yang begitu vital bagi metabolisme fosfor dan kalsium, dan merefleksikan kondisi tubuh. Meskipun penyerapan bukan merupakan fungsi primer epitel pipih banyak lapis (epidermis) kulit, namun banyak bahan mampu melewati barrier epidermis (Eroschenko, 2010).

Epidermis merupakan lapisan paling luar kulit dan terdiri atas epitel berlapis gepeng dengan lapisan tanduk. Epidermis hanya terdiri dari jaringan epitel, tidak mempunyai pembuluh darah maupun limfa, oleh karena itu semua nutrient dan oksigen diperoleh dari kapiler pada lapisan dermis. Epitel berlapis gepeng pada epidermis ini disusun oleh banyak lapis sel yang disebut keratinosit. Sel-sel ini secara tetap diperbarui melalui mitosis sel-sel dalam lapis sel basal yang secara berangsur digeser ke permukaan epitel. Selama perjalanannya, sel-sel ini berdiferensiasi, membesar, dan mengumpulkan filament keratin dalam sitoplasmanya. Mendekati permukaan, sel-sel ini mati dan secara tetap dilepaskan (terkelupas). Epidermis terdiri atas 5 lapisan yaitu, dari dalam ke luar, stratum basal, stratum spinosum, stratum granulosum, stratum lusidum, dan stratum korneum (Kalangi, 2013).

Dermis terdiri atas stratum papilaris dan stratum retikularis, batas antara kedua lapisan tidak tegas, serat antaranya saling menjalin. Stratum papilaris tersusun lebih longgar, ditandai oleh adanya papilla dermis yang jumlahnya bervariasi antara 50-250/mm². Jumlahnya terbanyak dan lebih dalam pada daerah

dimana tekanan paling besar, seperti pada telapak kaki. Sebagian besar papilla mengandung pembuluh-pembuluh kapiler yang memberi nutrisi pada epitel di atasnya. Papilla lainnya mengandung badan akhir di bawah epidermis serat-serat kolagen tersusun rapat. Stratum retikularis memiliki lapisan lebih tebal dan dalam. Berkas-berkas kolagen kasar dan sejumlah kecil serat elastin membentuk jalinan yang padat ireguler. Pada bagian lebih dalam, jalinan lebih terbuka, rongga-rongga di antaranya terisi jaringan lemak, kelenjar keringat dan sebacea, serta folikel rambut (Kalangi, 2013).

2.3 Kulit Jeruk Manis

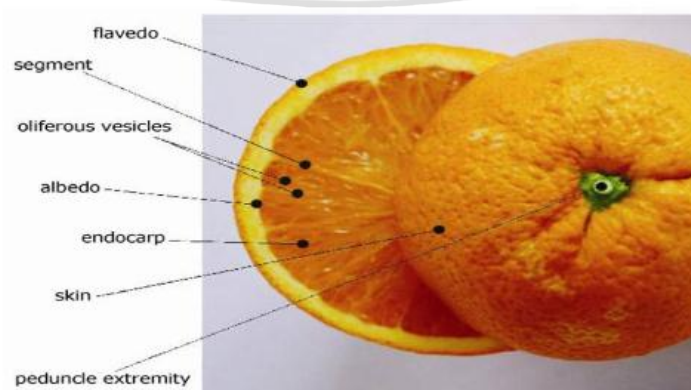
Jeruk manis berasal dari India Timur Laut, Cina Selatan, Birma Utara, dan Cochin Cina (daerah sekitar Vietnam). Tumbuhan ini merupakan tanaman yang dapat tumbuh baik di daerah tropis dan subtropics. Tanaman jeruk manis dapat mencapai ketinggian 3-10 m. Tangkai daun 0,5-3,5 cm. Helaian daun berbentuk elips atau bulat telur memanjang, dengan ujung tumpul atau meruncing tumpul. Buah jeruk berbentuk bulat atau bulat rata dan memiliki kulit buah yang tebal (sekitar 0,3-0,5 cm), daging buah kuning, jingga atau kemerah-merahan (Pracaya, 2000).

Jeruk Manis disebut juga jeruk peras mempunyai nama ilmiah *Citrus sinensis*. Klasifikasi tanaman jeruk manis menurut Milind dan Dev (2012), adalah sebagai berikut:

Kingdom	: Plantae
Divisi	: Magnoliophyta
Kelas	: Dicotyledons

Ordo	: Rosidae
Famili	: Rutaceae
Sub Famili	: Aurantoideae
Genus	: Citrus
Sub genus	: Papeda
Spesies	: <i>Citrus sinensis</i>

Buah jeruk banyak memiliki kandungan vitamin C, flavonoid, senyawa fenol, dan pectin. Menurut penelitian Nogata, *et al.* (2005), kandungan flavonoid dalam kulit jeruk manis lebih tinggi dibanding bagian jeruk lainnya dimana buah jeruk mengandung flavonoid sebanyak 865,8mg/100g berat buah segar dibandingkan kulit jeruk yang mengandung flavonoid sebanyak 2391mg/100g berat buah segar. Flavonoid tersebut antara lain neohesperidin, naringin, hesperidin, narirutin, triterpene, limonene. Hesperidin merupakan kandungan flavonoid terbanyak pada kulit jeruk yaitu 2070mg/100g berat basah. Kandungan penting dalam kulit jeruk manis adalah Vitamin C, kandungan vitamin C pada kulit jeruk yaitu 66,5 mg/100g berat kulit.



Gambar 2.3 Bagian-bagian buah jeruk manis (Sumber: Etebu dan Nwauzoma, 2014)

Bagian utama buah jeruk dari luar sampai ke dalam adalah kulit (tersusun atas flavedo, kelenjar minyak, albedo dan ikatan pembuluh), segmen-segmen (dinding segmen, rongga cairan, biji), *core* (bagian tengah yang terdiri dari ikatan pembuluh dan jaringan parenkim). Kulit jeruk secara fisik dapat dibagi menjadi dua bagian utama yaitu flavedo dan albedo (Etebu dan Nwauzoma, 2014).

Flavedo dicirikan dengan adanya warna hijau, kuning, atau orange. Pigmen yang terdapat pada flavedo adalah kloroplas dan karetenoid. Albedo merupakan jaringan seperti spon berwarna putih yang berhubungan dengan *core* di tengah buah. Albedo mempunyai fungsi mensuplai air dan nutrisi dari pohon untuk pertumbuhan dan perkembangan buah. Pada albedo tidak terdapat kloroplas ataupun kromoplas sehingga bagian ini berwarna putih. Albedo banyak mengandung senyawa flavon hesperides seperti hesperidin dan naringin serta senyawa-senyawa limonin yang lebih banyak dari flavedo maupun membrane buah. Senyawa-senyawa tersebut menyebabkan timbulnya rasa pahit pada produk sari buah jeruk. Senyawa pektin, enzim oksidase dan peroksidase sebagian besar ada pada kulit bagian dalam (Etebu dan Nwauzoma, 2014).

2.4 Terapi dalam Sediaan Oral

Terapi secara peroral merupakan pemberian terapi yang caya penggunaannya masuk melalui mulut. Keuntungan pemberian terapi melalui rute ini adalah relatif aman, praktis, dan ekonomis. Kerugian yang dapat terjadi adalah timbul efek lambat, tidak bermanfaat untuk pasien yang sering muntah, diare, atau tidak sadar. Untuk tujuan terapi serta efek sistematik yang dikehendaki,

penggunaan oral adalah yang paling menyenangkan dan murah, serta umumnya paling aman (Sanjoyo, 2005).

Obat yang masuk ke dalam tubuh melalui cara pemberian umumnya mengalami absorpsi, distribusi, dan pengikatan untuk sampai di tempat kerja dan menimbulkan efek. Untuk obat-obat tertentu, tidak semua yang diabsorpsi dari tempat pemberian akan mencapai sirkulasi sistemik. Sebagian akan dimetabolisme oleh enzim di dinding usus pada pemberian oral dan/atau di hati pada lintasan pertamanya melalui organ-organ tersebut. Setelah diabsorpsi, obat akan didistribusikan ke seluruh tubuh melalui sirkulasi darah. Distribusi obat dibedakan atas 2 fase berdasarkan penyebarannya di dalam tubuh. Distribusi fase pertama terjadi segera setelah penyerapan, yaitu ke organ yang perfusinya sangat baik misalnya jantung, hati, ginjal, dan otak. Selanjutnya, distribusi fase kedua jauh lebih luas yaitu mencakup jaringan yang perfusinya tidak sebaik organ siasat misalnya otot, viscera, kulit, dan jaringan lemak (Sanjoyo, 2005).

Biotransformasi atau metabolisme obat ialah proses perubahan struktur kimia obat yang terjadi dalam tubuh dan dikatalis oleh enzim. Pada proses ini molekul obat diubah menjadi lebih polar, artinya lebih mudah larut dalam air dan kurang larut dalam lemak sehingga lebih mudah dieksresikan melalui ginjal. Metabolit aktif akan mengalami biotransformasi lebih lanjut dan/atau diekskresikan sehingga kerjanya berakhir. Obat dikeluarkan dari tubuh melalui berbagai organ ekskresi dalam bentuk metabolit hasil biotransformasi atau dalam bentuk asalnya (Sanjoyo, 2005).

2.5 Terapi dalam Sediaan Topikal

Obat topikal merupakan salah satu aplikasi obat dengan menggunakan formulasi tertentu pada kulit yang bertujuan untuk mengobati penyakit kulit tertentu pada kulit atau penyakit sistemik yang bermanifestasi pada kulit. Terapi topikal merupakan terapi yang nyaman, namun keberhasilannya tergantung bagaimana kondisi kulit kita dan zat yang terkandung di dalam sediaan topikal tersebut. Keuntungan utama penggunaan obat topikal yaitu dapat memintas jalur metabolisme obat pertama di hati. Terapi topikal dapat menghindari risiko dan ketidaknyamanan seperti pada terapi yang diberikan secara intravena, serta sebagai hal yang mempengaruhi penyerapan obat pada terapi peroral, misalnya perubahan pH, aktivitas enzim, dan pengosongan lambung (Sharma, 2015; Gupta, 2002).

Obat topikal bekerja dengan cara masuk ke dalam permukaan kulit mengikuti suatu gradient konsentrasi (difusi pasif). Gradien konsentrasi ditimbulkan oleh perbedaan konsentrasi obat aktif dalam sediaan yang diaplikasikan pada kulit dan konsentrasi obat aktif dalam jaringan kulit serta jaringan di bawahnya (Schaefer *et al.*, 2008). Salep merupakan sediaan setengah padat yang mudah dioleskan dan dapat digunakan pada kulit maupun mukosa. Salep berbahan hidrokarbon memiliki efek sebagai emolien, efek oklusi, dan mampu bertahan pada permukaan kulit dalam waktu lama tanpa mengering (Wyatt *et al.*, 2001).

2.6 Tumor Necrosis Factor-Alpha (TNF- α)

Tumor Necrosis Factor-Alpha (TNF- α) merupakan mediator utama pada inflamasi akut yang dapat menyebabkan komplikasi sistemik pada infeksi yang berat. TNF- α merupakan anggota dari *peptide mediator family* pertumbuhan yang terdiri dari kurang lebih 19 sitokin, termasuk lymphotoxin- α , fas ligand, dan CD40⁺ ligand. TNF- α memiliki sifat pro-inflamasi, yang berperan penting pada imunitas *innate* dan adaptif, proliferasi sel, dan proses apoptosis (Abbas, *et al.*, 2010). Sitokin ini diproduksi oleh beragam sel, termasuk makrofag, monosit, sel T, sel otot polos, adiposit dan fibroblast (Papa *et al.*, 2007).

Reseptor TNF- α termasuk dalam famili yang memiliki paling tidak 12 anggota, termasuk *Nerve Growth Factor* dan reseptor CD95⁺ (APO1/Fas). Dua reseptor TNF telah diidentifikasi dan disebut sebagai TNFR1 atau (p55 pada tikus, p60 pada manusia) dan TNFR2 (p75 pada tikus, p80 pada manusia) (Qi, 2000). Pada banyak tipe sel, termasuk sel endotel, TNFR2 terutama diekspresikan pada permukaan sel, sedangkan TNFR1 terdapat dominan di golgi dengan sedikit ekspresi pada permukaan. Aktivitas p55 memiliki keistimewaan mengaktivasi kaspase dan kemudian menginduksi apoptosis, yang selanjutnya dikenal sebagai *death domain* dimana tidak terdapat pada p75, sedangkan p75 berkaitan dengan ETK (*Endothelial/Epithelial Tyrosine Kinase*) dan terlibat dalam migrasi dan angiogenesis sel endotel yang diinduksi oleh TNF- α (Pan *et al.*, 2002).

2.7 Kolagen dalam Penyembuhan Luka

Penyembuhan luka merupakan salah satu proses dinamis yang secara singkat meliputi proses inflamasi, diikuti oleh proses fibrosis atau fibroplasia,

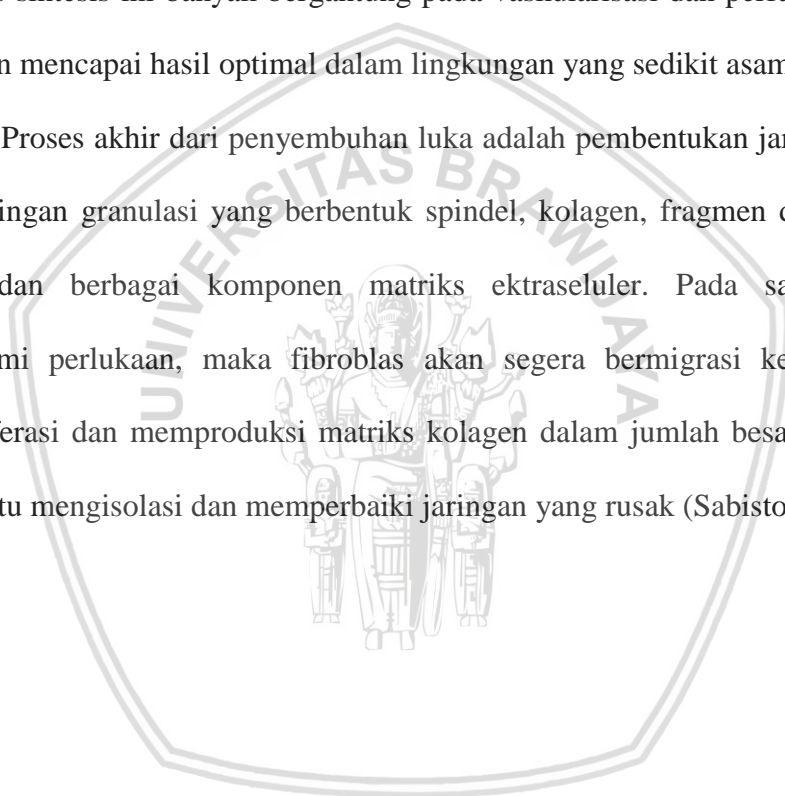
selanjutnya *remodelling* jaringan dan pembentukan jaringan parut. Proses fibrosis atau fibroplasia dan pembentukan jaringan parut merupakan proses perbaikan yang melibatkan jaringan ikat yang terdiri dari empat komponen, pembentukan pembuluh darah baru, migrasi dan proliferasi fibroblast, deposisi ECM (*Extracellular Matrix*), dan *remodeling*. Dari keseluruhan proses tersebut, fibroblast memiliki peran penting pada proses fibrosis yang melibatkan dua dari keempat komponen diatas yaitu migrasi dan proliferasi fibroblas serta deposisi ECM oleh fibroblas (Flavell *et al.*, 2008).

Pada proses inflamasi terjadi perubahan vaskuler yang mempengaruhi besar, jumlah, dan permeabilitas pembuluh darah serta perubahan seluler yang menyebabkan kemotaksis ke arah jejas setelah proses inflamasi berkurang, dilanjutkan dengan proses fibrosis tahap awal yaitu migrasi dan proliferasi di daerah jejas. Migrasi dan proliferasi fibroblast terutama dipacu oleh *Transforming Growth Factor* (TGF- β), yaitu faktor pertumbuhan yang dihasilkan oleh jaringan granulasi yang terbentuk selama proses inflamasi. Migrasi dan peningkatan proliferasi fibroblast di daerah jejas akan meningkatkan sintesis kolagen dan fibronectin, serta peningkatan deposisi matriks ekstraseluler (Sabiston, 2000).

Pada tahap selanjutnya terjadi penurunan proliferasi sel endotel dan sel fibroblas, namun fibroblas menjadi lebih prograsif dalam mensintesis kolagen dan fibronectin sehingga meningkatkan jumlah matriks ekstraseluler yang berjurang selama inflamasi. Selain TGF- β , beberapa faktor pertumbuhan lain yang ikut mengatur proliferasi fibroblas juga membantu mestimhlasi sintesis matriks

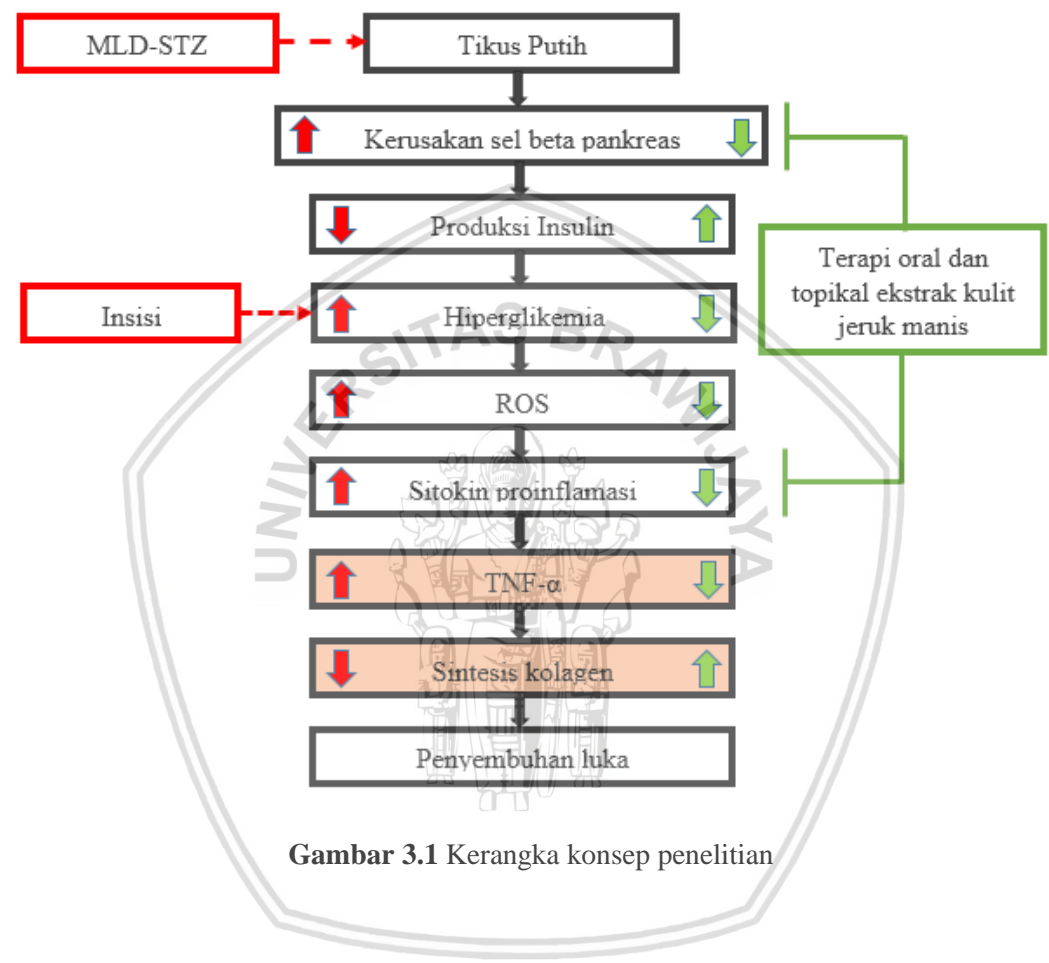
ekstraseluler. Pembentukan serabut kolagen pada daerah jejas merupakan hal yang penting untuk meningkatkan kekuatan penyembuhan luka. Sintesis kolagen oleh fibroblas dimulai relatif awal pada proses penyembuhan (hari ke 3-5) dan berlanjut hingga beberapa minggu tergantung ukuran luka. Menurut Soder dan Saleh (2000), sintesis kolagen oleh fibroblas mencapai puncaknya pada hari ke 5-7. Proses sintesis ini banyak bergantung pada vaskularisasi dan perfusi di daerah luka, dan mencapai hasil optimal dalam lingkungan yang sedikit asam.

Proses akhir dari penyembuhan luka adalah pembentukan jaringan parut, yaitu jaringan granulasi yang berbentuk spindel, kolagen, fragmen dari jaringan elastik dan berbagai komponen matriks ekstraseluler. Pada saat jaringan mengalami perlukaan, maka fibroblas akan segera bermigrasi ke area luka, berproliferasi dan memproduksi matriks kolagen dalam jumlah besar yang akan membantu mengisolasi dan memperbaiki jaringan yang rusak (Sabiston, 2000).











BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konseptual



Gambar 3.1 Kerangka konsep penelitian

Keterangan gambar:

- | | | | |
|---|-----------------------|---|--------------------|
|  | : Variabel kontrol |  | : Jalur pada tikus |
|  | : Variabel terikat |  | : Menghambat |
|  | : Variabel bebas |  | : Perlakuan |
|  | : Efek streptozotocin |  | : Efek terapi |

Multiple Low Dose Streptozotocin (MLD-STZ) bekerja dengan cara membentuk radikal bebas sangat reaktif yang dapat menimbulkan kerusakan pada membran sel, protein, dan *deoxyribonucleic acid* (DNA). MLD-STZ menembus sel β pankreas melalui transporter glukosa GLUT 2. Aksi STZ intraseluler menghasilkan perubahan DNA sel β pankreas. Alkilasi DNA oleh MLD-STZ melalui gugus nitrogen mengakibatkan kerusakan pada sel β pankreas. Pemindahan gugus metil dari MLD-STZ ke molekul DNA menyebabkan kerusakan DNA sel β pankreas. Glikosilasi protein juga dapat menjadi faktor penyebab kerusakan DNA. Kerusakan DNA akibat MLD-STZ dapat mengaktifasi *poly (ADP-ribose) polymerase* (PARP) yang kemudian mengakibatkan penekanan *nicotinamide adenine dinucleotide* (NAD^+) seluler, selanjutnya menimbulkan penurunan jumlah *adenosine triphosphate* (ATP), dan akhirnya terjadi nekrosis sel β pankreas. Adanya nekrosis sel β pankreas akan menyebabkan gangguan produksi insulin yang dihasilkannya. Insulin memegang peranan penting dalam proses metabolisme karbohidrat, lemak, dan protein. Gejala awal DM berhubungan dengan efek langsung dari kadar glukosa darah yang tinggi. Keadaan kadar glukosa darah yang melebihi normal disebut hiperglikemia.

Hiperglikemia dapat meningkatkan senyawa oksigen reaktif (ROS) melalui jalur AGE (*Advanced Glycosylation end Product*), poliol, aktivasi protein Kinase C (PKC), aktivasi jalur heksosamin, dan pembentukan ROS pada mitokondria. Insisi pada tikus diabetes mellitus menyebabkan reaksi inflamasi pada luka yang ditandai dengan adanya makrofag. Makrofag memproduksi ROS yang jumlahnya meningkat pada fase inflamasi penyembuhan luka dan berperan

penting dalam produksi mediator inflamasi salah satunya TNF- α . Meningkatnya ROS secara sistemik pada penderita DM akan menyebabkan produksi inflamasi dikeluarkan secara terus menerus sehingga dalam keadaan luka fase inflamasi akan berlangsung lebih lama.

TNF- α dapat memicu aktivasi enzim *matrixmetalloproteinase* (MMP), suatu enzim yang berfungsi untuk degradasi komponen matriks ekstra seluler (ECM). Kolagen merupakan protein utama yang menyusun komponen ECM dan merupakan protein terbanyak yang ditemukan dalam tubuh manusia. Proses inflamasi yang berkepanjangan dapat menghambat sintesis jaringan kolagen sehingga menyebabkan lamanya proses penyembuhan luka.

Ekstrak kulit jeruk manis diberikan secara oral dan topikal dengan tujuan mempercepat proses penyembuhan luka insisi. Kulit jeruk manis mengandung berbagai senyawa penting diantaranya vitamin A, vitamin C, vitamin E, dan flavonoid. Flavonoid dapat berperan sebagai antioksidan dengan mengikat radikal bebas sehingga dapat mengurangi stress oksidatif. Jika stress oksidatif berkurang maka dapat mengurangi resistensi terhadap kerja insulin dapat mencegah perkembangan disfungsi dan kerusakan sel beta pankreas (Kaempe dkk., 2013). Vitamin A sangat penting bagi fungsi dan integritas sel epitel normal dengan membantu menstimulasi sekresi mucus pada permukaan sel epitel untuk melapisi dan melindungi jaringan dari invasi mikroorganisme dan mendukung diferensiasi sel epitel. Vitamin C menyebabkan daerah luka menjadi tahan terhadap infeksi dengan memfasilitasi migrasi leukosit ke area luka. Kandungan vitamin E memiliki aktivitas anti-inflamasi dan antioksidan dengan memblokir

prostaglandin *pathway* pada aktivitas *cyclooxygenase* (COX). Flavonoid menginduksi produksi transforming growth factor (TGF)-beta, yang meregulasi ekspresi ECM dan MMP. Kandungan hesperidinnya bersifat sebagai antibakteri sementara kandungan PMF bekerja dengan mengurangi kuantitas COX-2 (Kartikaningtyas, dkk., 2015). Kombinasi pemberian terapi ekstrak kulit jeruk manis secara oral dan topikal akan menghambat proses terjadinya inflamasi berkepanjangan. Berakhirnya proses inflamasi menandakan luka mulai membaik.

3.2 Hipotesa Penelitian

Berdasarkan kerangka konseptual, maka hipotesis dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Terapi ekstrak kulit jeruk manis secara oral dan topikal mampu menurunkan ekspresi TNF- α yang berkaitan dengan penyembuhan luka insisi pada tikus model diabetes mellitus.
2. Terapi ekstrak kulit jeruk manis secara oral dan topikal mampu memperbaiki tingkat kepadatan kolagen yang berkaitan dengan penyembuhan luka insisi pada tikus model diabetes mellitus.

BAB 4 METODE PENELITIAN

4.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan April – Agustus 2017 di Laboratorium Fisiologi Hewan Coba Fakultas Saintek Universitas Islam Negeri Malang, pembuatan ekstrak kulit jeruk manis dilakukan di Materia Medica Batu, pembuatan sediaan terapi dilakukan di Laboratorium Parasitologi Veteriner dan Laboratorium Kesehatan Masyarakat Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya, pembuatan imunohistokimia dilakukan di Laboratorium Ilmu FAAL Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, dan pembuatan preparat histologi dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga.

4.2 Alat dan Bahan Penelitian

4.2.1 Alat Penelitian

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini, antara lain kandang tikus, tempat minum, timbangan, *rotary evaporator*, *waterbath*, *digital shaker*, oven, mortar, *aluminium foil*, spatula, glukometer, sonde lambung, spuit, cawan petri, gunting, *scalpel*, *blade*, pinset, silet, *ice box*, *freezer*, gelas penutup, gelas objek, *vortex*, tabung falkon 15 ml, gelas beker 100 ml, papan bedah, pot organ, *microtome*, *dehydrator autotechnicon*, kapas steril, *tissue*, masker, *gloves*, dan mikroskop (Olympus BX51).

4.2.2 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini, antara lain pakan tikus, kulit jeruk manis, etanol 96%, dekstrin, asam sitrat, asam tartrat, natrium nikarbonat, streptozotocin, natrium sitrat, vaselin album, ketamine, xylazine, akuades, alkohol 70%, povidone iodine, alkohol bertingkat (70%, 80%, 90%, dan 95%), parafin cair, formalin 10%, xylol, larutan *boin's*, larutan *weigert's iron hematoxylin*, larutan *biebrich scarlet-acid fuchsin*, larutan *aniline blue*, larutan asam glasial asetat, *xylene*, balsam kanada, etanol bertingkat (100%, 90%, 80%, 70%), PBS, BSA (*Bovine Serum Albumin*) 1%, antibodi TNF- α (Vq-1), *Strep Avidin Horse Radish Peroxidase* (SA-HRP), dan *Mayer Hematoxylen*.

4.3 Tahapan Penelitian

4.3.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian yang bersifat eksperimental dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL), karena media yang dipergunakan dalam penelitian sama atau dianggap seragam (Kusriningrum, 2008). Pada penelitian ini hewan coba dibagi menjadi lima kelompok perlakuan, masing-masing kelompok terdiri dari 4 ekor tikus. Kelompok (1) adalah kontrol negatif berisi tikus tanpa DM dengan insisi tanpa terapi. Kelompok (2) adalah kontrol positif berisi tikus DM dengan insisi tanpa terapi. Kelompok (3) tikus DM dengan insisi yang diberi terapi ekstrak kulit jeruk manis secara oral dengan dosis 500 mg/kg BB. Kelompok (4) tikus DM dengan insisi yang diberi terapi ekstrak kulit jeruk manis secara topikal (salep

konsentrasi 5%). Kelompok (5) adalah tikus DM dengan insisi yang diberi terapi ekstrak kulit jeruk manis secara kombinasi oral dan topikal.

4.3.2 Sampel Penelitian

Sampel penelitian ini menggunakan hewan coba berupa tikus jantan (*Rattus norvegicus*) galur wistar berumur 2 bulan dengan berat badan 150-200 gram, hewan coba yang digunakan sebanyak 20 ekor dan diadaptasikan selama tujuh hari untuk penyesuaian dengan kondisi laboratorium. Adapun estimasi besar sampel dihitung berdasarkan rumus (Kusriningrum, 2008):

$$t(n-1) \geq 15$$

$$5(n-1) \geq 15$$

$$5n-5 \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 20/5$$

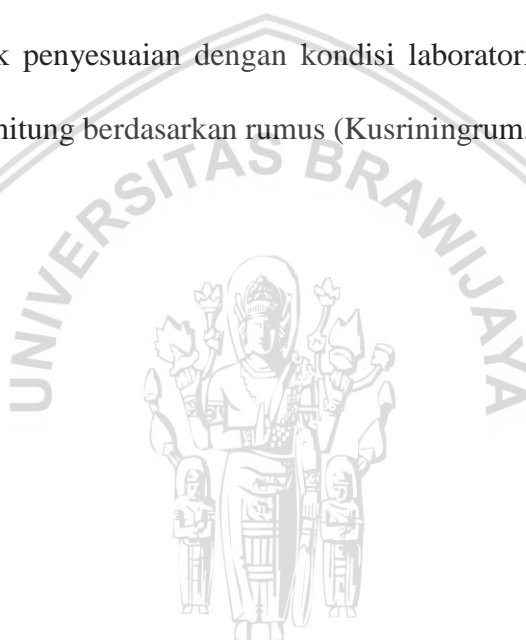
$$n \geq 4$$

Keterangan:

t = jumlah kelompok perlakuan

n = jumlah ulangan yang diperlukan

Berdasarkan perhitungan diatas, maka dapat disimpulkan bahwa dalam 5 macam kelompok perlakuan diperlukan jumlah tikus sebanyak 4 kali ulangan dalam setiap kelompok, sehingga dibutuhkan total 20 ekor tikus (*Rattus norvegicus*) sebagai hewan coba.



Tabel 4.1 Rancangan Kelompok Penelitian

Kelompok Perlakuan	Perlakuan
1 (Kontrol negatif)	Tikus tanpa DM dengan insisi tanpa terapi
2 (Kontrol positif)	Tikus DM dengan insisi 2 cm tanpa terapi
3 (Terapi oral)	Tikus DM dengan insisi 2 cm diberi terapi peroral ekstrak kulit jeruk manis dosis 500 mg/kg BB
4 (Terapi topikal)	Tikus DM dengan insisi 2 cm diberi terapi topikal salep ekstrak kulit jeruk manis konsentrasi 5%
5 (Terapi oral dan topikal)	Tikus DM dengan insisi 2 cm diberi terapi kombinasi oral dan topikal

4.3.3 Variabel Penelitian

Adapun variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

Variabel bebas : Ekstrak kulit jeruk manis.

Variabel tergantung : Ekspresi TNF- α dan kepadatan kolagen pada jaringan kulit

Variabel terkendali : Streptozotocin, homogenitas tikus (*Rattus norvegicus*) yang terdiri dari strain, jenis kelamin, berat badan, umur, pakan, suhu ruangan, dan kelembapan kandang.

4.4 Prosedur Kerja

4.4.1 Persiapan Hewan Coba

Hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus (*Rattus norvegicus*) strain wistar jantan umur 2 bulan dengan berat badan 150-200 gram. Tikus yang digunakan dalam penelitian diaklimatisasi selama tujuh hari terhadap lingkungan yang bertujuan untuk mengurangi stres pada hewan coba, serta tikus diberikan pakan berupa ransum basal pada semua tikus secara *ad libitum*. Hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini dibagi menjadi lima kelompok perlakuan dengan masing-masing diletakkan dalam kandang individu. Kandang tikus yang digunakan harus berlokasi pada tempat yang bebas dari kebisingan, kegaduhan, dan terhindar dari asap industri beserta polutan lainnya. Lantai kandang yang dibuat harus mudah dibersihkan dan disanitasi, serta kandang sesuai dengan suhu ruang.

4.4.2 Ekstraksi Kulit Jeruk Manis

Pembuatan ekstrak jeruk manis (*Citrus sinensis*) dilakukan dengan menggunakan metode maserasi. Kulit buah jeruk didapatkan dari penjual di kota Malang. Kulit buah jeruk manis kemudian dikeringkan dibawah sinar matahari selama 7 hari. Kulit yang sudah kering dihaluskan sehingga diperoleh sediaan serbuk kering. Serbuk kulit jeruk manis ditimbang sebanyak 500 gram kemudian direndam dengan pelarut etanol 96% sebanyak 2 liter dalam wadah toples tertutup. Toples kemudian diletakkan diatas shaker digital dengan kecepatan 50 rpm selama 24 jam. Ekstrak cair yang diperoleh kemudian disaring menggunakan kain penyaring dan ditampung dalam Erlenmeyer. Hasil

ekstrak diuapkan menggunakan *rotary evaporator* selama 3 jam. Ekstrak yang dihasilkan kemudian diletakkan di atas *waterbath* selama 2 jam untuk menghilangkan sisa pelarut.

4.4.3 Pembuatan Sediaan *Effervescent*

Sediaan *effervescent* dibuat menggunakan metode granulasi kering. Ekstrak kering untuk pembuatan *effervescent* didapat dengan cara mencampur ekstrak kulit jeruk manis dengan dekstrin (1:1), kemudian dimasukkan ke dalam oven suhu 60 °C selama 10 jam. Hasil oven dihaluskan menggunakan mortar sehingga didapatkan ekstrak sediaan serbuk. *Effervescent* dibuat dengan mencampurkan ekstrak kulit jeruk manis serbuk, asam sitrat, asam tartrat, dan natrium bikarbonat (3,5:1:1,5:3) (Novidianto dan Setyowati, 2008). Semua bahan dicampur menggunakan mortar sampai homogen, kemudian disimpan dalam wadah tertutup.

4.4.4 Pembuatan Sediaan Salep

Sediaan salep dibuat menggunakan metode *geometric dillution* dengan mencampurkan vaselin album sebagai bahan dasar dan ekstrak kulit jeruk manis. Konsentrasi salep 5% (Ramasany and Bhaskar, 2016) dibuat dengan cara mencampurkan ekstrak kulit jeruk manis sebanyak 1 gram ditambahkan dengan vaselin album sehingga diperoleh campuran sebanyak 20 gram. Salep kemudian dibungkus dalam aluminium foil.

4.4.5 Induksi Diabetes Mellitus pada Hewan Coba

Tikus DM diperoleh dengan cara injeksi MLD-STZ (dosis 20 mg/kg BB) secara intraperitoneum selama 5 hari berturut-turut (Aulanni'am *et al.*,

2005). Tikus diinkubasi selama 14 hari, kemudian dilakukan pengukuran kadar gula darah menggunakan glukometer. Pengukuran dilakukan dengan cara meneteskan darah yang diambil melalui ekor ke glukometer. Tikus dinyatakan DM jika kadar glukosa lebih dari 200 mg/dl (Carvalho *et al.*, 2003).

4.4.6 Pembuatan Insisi

Tikus terlebih dahulu dianestesi secara intraperitoneal menggunakan ketamine (dosis 80 mg/kg BB) dan xylazine (dosis 10 mg/kg BB). Rambut di sekitar daerah yang akan dilakukan insisi dicukur lalu dibersihkan dengan povidone iodine. Kemudian dilakukan penyayatan daerah punggung menggunakan *scalpel* sepanjang 2 cm (Alizadeh, 2010) dengan kedalaman kurang lebih 0,2 cm sampai lapisan dermis (Das, 2013). Luka insisi dibiarkan terekspos dengan lingkungan tanpa dilakukan penutupan dan penjahitan.

4.4.7 Pemberian Terapi Ekstrak Kulit Jeruk Manis

Pemberian ekstrak kulit jeruk manis sebagai terapi perlakuan diberikan secara oral dan topikal. Terapi diberikan sekali per hari selama 10 hari. Kelompok 3 diberi terapi secara peroral menggunakan sonde dengan dosis 500 mg/kg BB (Muhtadi *et al.* 2015). Kelompok 4 diberi terapi topikal dengan mengoleskan salep sebanyak kurang lebih 0,1 gram pada daerah luka. Kelompok 5 diberi terapi kombinasi secara oral dan topikal.

4.4.8 Eutanasi dan Pengambilan Jaringan Kulit

Eutanasi dilakukan dengan cara dislokasi pada bagian leher tikus. Setelah itu tikus diletakkan rebah ventral dan dilakukan pengambilan kulit.

Kulit diambil selebar kurang lebih 1 cm dari tepi luka. Organ kulit kemudian dimasukkan dalam larutan formalin 10% selama 24 jam.

4.4.9 Pembuatan Preparat Histopatologi

Tahapan pembuatan preparat histopatologi kulit terdiri dari fiksasi, dehidrasi, *clearing*, impregnasi, dan *embedding* (Ashari, 2013).

1. Fiksasi

Jaringan dimasukkan dalam larutan formalin 10%. Lamanya fiksasi jaringan 18-24 jam. Setelah fiksasi selesai, jaringan dimasukkan dalam larutan aquades selama 1 jam agar larutan fiksasi hilang. Fiksasi bertujuan sebagai pengawetan jaringan dan menghambatn proses pembusukan, serta untuk mempertahankan sel atau jaringan agar tidak mengalami perubahan bentuk maupun ukuran.

2. Dehidrasi

Jaringan dimasukkan ke dalam alkohol konsentrasi bertingkat (alkohol 70, 80, 90, 95%, dan alkohol absolut) dengan menggunakan alat *dehydrator autotechnicon* selama 2 jam. Dehidrasi adalah proses penarikan molekul air dari dalam jaringan. Tujuan dari dehidrasi adalah agar seluruh ruang-ruang antar sel dalam jaringan dapat diisi dengan molekul parafin. Dehidrasi menggunakan alkohol bertingkat dari konsentrasi rendah ke tinggi. Hal ini dilakukan ntuk menjaga agar tidak terjadi perubahan tiba-tiba pada sel dan jaringan.

3. *Clearing*

Jaringan kemudian dimasukkan ke dalam larutan alkohol-xylol selama 1 jam. Kemudian xylol murni selama 4 jam. *Clearing* adalah proses penjernihan atau mentransparankan jaringan. *Clearing* berfungsi untuk menarik alkohol atau dehidran yang lain dari dalam jaringan agar dapat digantikan oleh molekul parafin.

4. Impregnasi

Potongan jaringan dimasukkan dalam parafin cair. Impregnasi dapat juga disebut infiltrasi parafin yaitu proses pengeluaran xylol dari dalam jaringan yang akan digantikan oleh parafin cair.

5. *Embedding*

Potongan jaringan dalam parafin padat dengan titik lebur 56-58 °C, ditunggu hingga parafin menjadi padat. Jaringan dalam parafin dipotong 4 µm dan ditempelkan pada *object glass* dan dipanaskan dalam inkubator dengan suhu 60 °C hingga parafin mencair. *Embedding* merupakan proses penanaman jaringan ke media parafin. Tujuannya adalah untuk mempermudah dalam melakukan proses pemotongan atau pengirisan sampel.

4.4.10 Pewarnaan Kolagen dengan *Masson's Trichrome*

Fiksasi preparat dengan formalin 10%, kemudian dilakukan deparafinisasi dengan akuades, dimasukkan ke dalam larutan *boin's* selama 1 jam pada suhu 56 °C, didinginkan dan dicuci dengan air mengalir kemudian bilas dengan akuades. Masukkan preparat ke dalam larutan *weigert's iron hematoxylin* selama 10 menit, kemudian cuci dengan air mengalir selama 10

menit dan bilas menggunakan akuades. Preparat kemudian direndam ke dalam larutan *biebrich scarlet-acid fuchsin* selama 2 menit, kemudian bilas kembali menggunakan aquades, kemudian dimasukkan ke dalam larutan asam *phosphomolybdic-phosphotungstic* selama 10 menit lalu larutan *aniline blue* selama 5 menit, kemudian bilas dengan akuades, kemudian dimasukkan ke dalam larutan asam glasial asetat selama 3 menit lakukan dehidrasi menggunakan alkohol 95% dan 100%, kemudian dibersihkan dengan *xylene* sebanyak dua kali, kemudian dilakukan *mounting* dengan balsam kanada, preparat, preparat diberi entelan dan ditutup dengan *object glass*.

Pengecatan *Masson's Trichrome* merupakan pengecatan khusus untuk serat elastin dan retikulin (serat jaringan ikat yang ada dalam organ), serat retikulin adalah serat kolagen yang kaya akan selubung glikoprotein, serat kolagen akan namak berwarna biru pada pewarnaan ini (Cotran, *et al.*, 2003). Pengukuran kepadatan kolagen dilakukan menggunakan *software Image Raster* dan dianalisa secara deskriptif.

4.4.11 Ekspresi TNF- α dengan Imunohistokimia

Metode pewarnaan imunohistokimia diawali dengan perendaman slide preparat pada xylol 1, xylol 2, dan etanol bertingkat (100%, 90%, 80%, 70%). Slide preparat kemudian dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit sebanyak 3 kali selanjutnya ditetesi dengan 3% H₂O₂ selama 20 menit. Setelah itu dicuci kembali dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit sebanyak 3 kali dan diblok dengan 1% BSA (*Bovine Serum Albumin*) selama 30 menit pada suhu ruang. Setelah itu slide preparat dicuci kembali dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit sebanyak 3

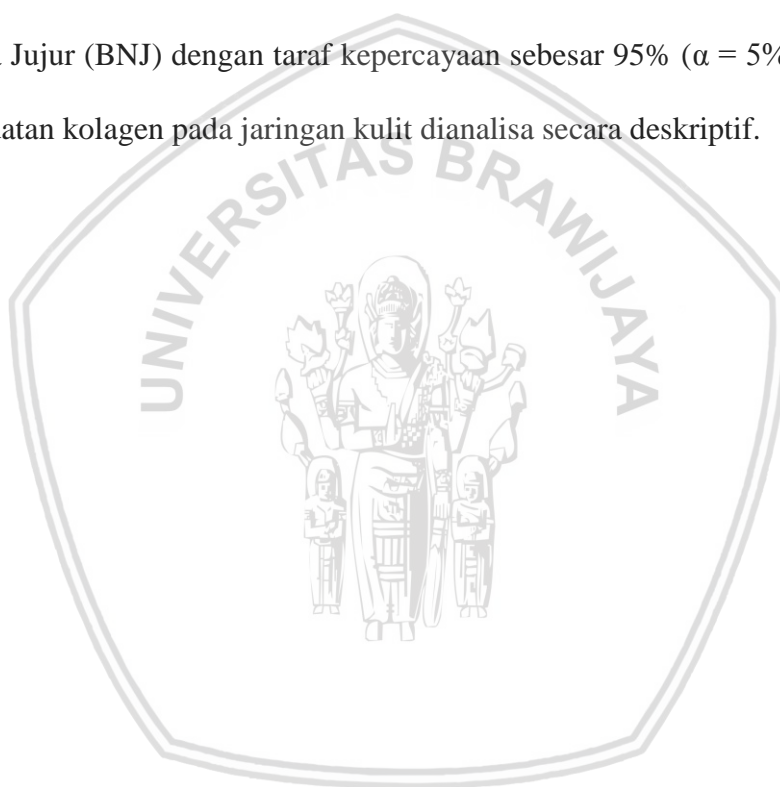
kali dan selanjutnya diinkubasi dengan antibodi primer *anti rat* TNF- α (pengenceran 1:50) selama semalam pada suhu 40 °C, kemudian dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit sebanyak 3 kali. Preparat diinkubasi dengan antibodi sekunder berlabel *rabbit anti rat* igG berlabel biotin selama 1 jam dengan suhu ruang. Selanjutnya dicuci kembali dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit 3 kali.

Slide preparat ditetesi dengan *Strep Avidin Horse Radish Peroxidase* (SA-HRP) selama 40 menit. Kemudian dicuci kembali dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit sebanyak 3 kali. Ditetesi dengan kromagen *Diamano Benzidine* (DAB) selama 10 menit. Dicuci kembali dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit 3 kali. *Counterstaining* menggunakan *Mayer Hematoxylen* selama 5 menit. Preparat dicuci dengan air mengalir kemudian dibilas dengan akuades dan dikeringkan. Preparat di *mounting* dengan entelan dan ditutup dengan *cover glass*. Pengamatan dilakukan dengan perbesaran 400x dengan lima bidang pandang pengamatan. Hasil pengamatan ekspresi TNF- α akan tampak warna kecoklatan pada sitoplasma sel endotel (Junquiera and Carneiro, 2007).

Pengukuran presentase area ekspresi TNF- α dilakukan dengan menggunakan *software Immunoratio*. Data yang diperoleh dianalisa secara statistik menggunakan *SPSS for Windows 23* untuk uji ANOVA (*Analysis of Variance*) satu arah dan uji Beda Nyata Jujur atau uji *Tukey* dengan tingkat signifikansi $\alpha=5\%$.

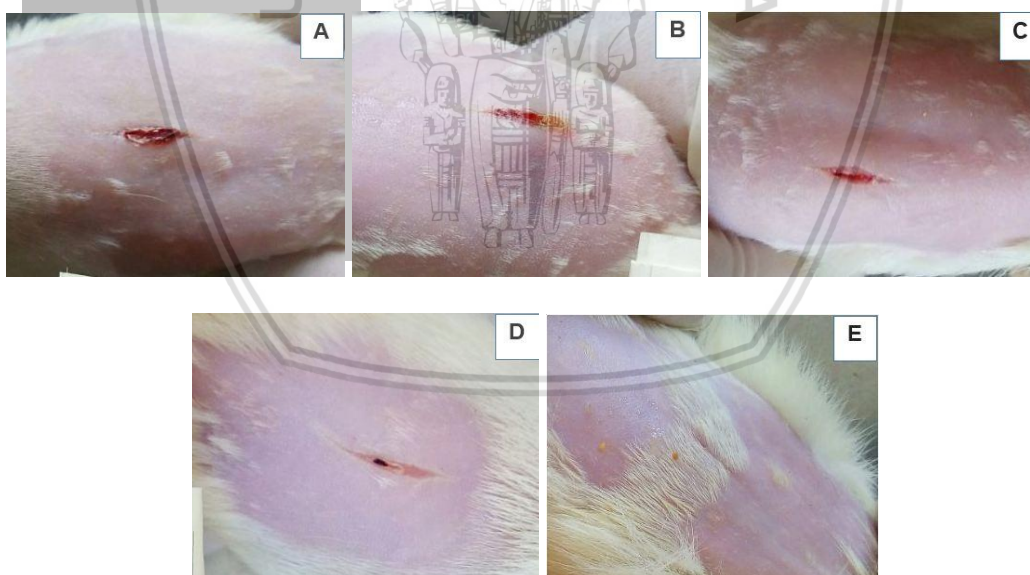
4.4.12 Analisa Data

Variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah ekspresi TNF- α dan kepadatan kolagen. Ekspresi TNF- α pada jaringan kulit dihitung menggunakan *software immunoratio* kemudian dianalisa menggunakan ragam *analysis of variance* (ANOVA) dengan menggunakan program SPSS (*Statistic Product of Service Solution*) 23 *for windows* dan dilanjutkan dengan uji Tukey atau Beda Nyata Jujur (BNJ) dengan taraf kepercayaan sebesar 95% ($\alpha = 5\%$), sementara kepadatan kolagen pada jaringan kulit dianalisa secara deskriptif.



BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN

Tikus (*Rattus norvegicus*) yang telah diinduksi MLD-STZ dilakukan observasi dan pengecekan kadar glukosa darah untuk memastikan bahwa tikus sudah mengalami diabetes mellitus. Kadar glukosa darah tikus yang mengalami diabetes yaitu >200 mg/dl (Carvalho *et al.*, 2003). Kadar glukosa darah diukur dengan mengambil darah dari vena coccygea dan diukur menggunakan glukometer. Kadar glukosa darah tikus yang menunjukkan >200 mg/dl kemudian ditandai menggunakan spidol pada ekornya. Insisi kemudian dilakukan pada daerah punggung sepanjang 2 cm, kemudian diberi terapi ekstrak kulit jeruk manis selama 10 hari.



Gambar 5.1 Gambaran makroskopis perkembangan kesembuhan jaringan kulit tikus pasca 10 hari terapi.

Keterangan: (A) kontrol negatif. (B) kontrol positif. (C) terapi oral *effervescent* kulit jeruk manis 500 mg/kg BB. (D) terapi salep ekstrak kulit jeruk manis konsentrasi 5%. (E) terapi kombinasi oral dan salep

Gambaran makroskopis terlihat berbeda pada masing-masing kelompok seperti yang terlihat pada **Gambar 5.1**. Kondisi luka tikus kontrol negatif (**Gambar 5.1 A**) menunjukkan luka belum menutup namun sudah mulai mengering serta terbentuk sedikit keropeng. Kondisi luka insisi tikus kontrol positif (**Gambar 5.2 B**) menunjukkan luka belum menutup dan terlihat sedikit basah. Kondisi luka yang masih basah ini menandakan fase inflamasi yang diperpanjang akibat kondisi diabetes.

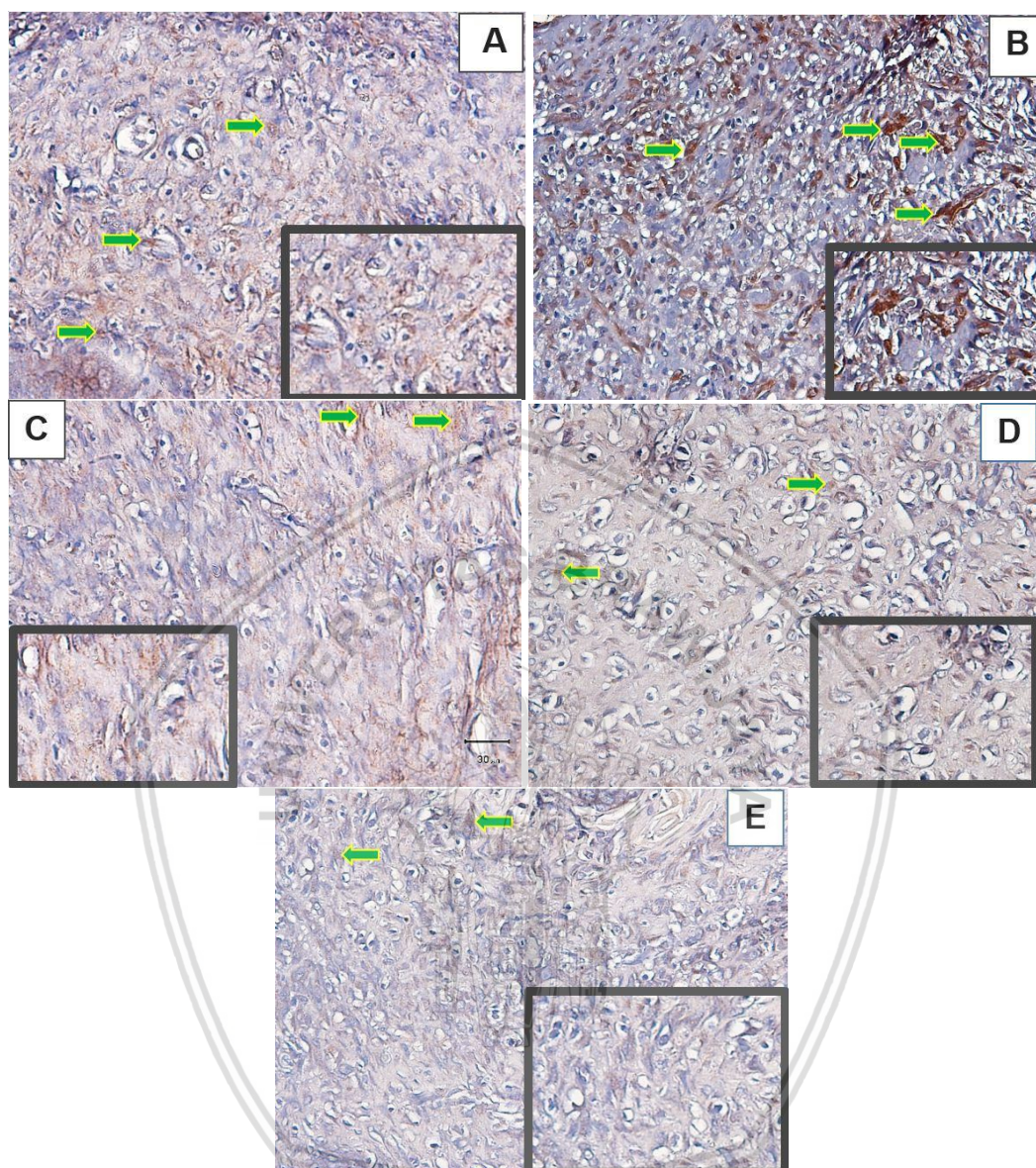
Kondisi luka insisi tikus terapi oral (**Gambar 5.1 C**) menunjukkan mulai adanya penutupan luka tanpa adanya keropeng namun masih terlihat merah pada area insisi. Kondisi luka insisi tikus terapi salep (**Gambar 5.1 D**) menunjukkan penutupan luka yang lebih baik daripada terapi oral, luka lebih tertutup dan warnanya terlihat lebih merah muda. Kondisi luka insisi tikus terapi kombinasi (**Gambar 5.1 E**) menunjukkan penutupan luka yang paling baik dibanding kelompok lainnya, luka sudah terlihat cukup tertutup, tidak ada warna kemerahan dan keropeng, serta mulai terlihat penumbuhan rambut disekitar area insisi. Untuk mengetahui pengaruh pemberian terapi ekstrak kulit jeruk manis terhadap ekspresi TNF- α dilakukan metode imunohistokimia dan kepadatan kolagen menggunakan pewarnaan *Masson's Trichrome*.


5.1 Pengaruh Pemberian Ekstrak Kulit Jeruk Manis terhadap Ekspresi TNF- α pada Penyembuhan Luka Insisi Tikus Model Diabetes

Pemeriksaan ekspresi TNF- α menggunakan metode imunohistokimia. Metode imunohistokimia (IHK) merupakan suatu proses identifikasi protein

spesifik pada jaringan atau sel menggunakan antibodi spesifik (Sukmadadari, 2012). Prinsip metode imunohistokimia adalah perpaduan antara reaksi imunologi dan reaksi kimiawi. Reaksi imunologi ditunjukkan dengan adanya ikatan antara antigen dan antibodi, sedangkan reaksi kimiawi merupakan ikatan antara enzim dan substrat. Ekspresi TNF- α dengan teknik imunohistokimia ditunjukkan dengan adanya ekspresi warna kecoklatan.

Ekspresi TNF- α terlihat pada semua kelompok. Ekspresi TNF- α tersebar pada bagian pembuluh darah dan jaringan ikat yang ditunjukkan dengan tanda panah. Ekspresi TNF- α paling banyak terdapat pada area pembuluh darah tepatnya pada sitoplasma karena TNF- α dikeluarkan oleh makrofag yang berasal dari aliran darah menuju sel target yang mengalami kerusakan. Warna coklat pada gambaran imunohistokimia dihasilkan dari ikatan antara antigen (TNF- α) dalam jaringan kulit dengan antibodi primer (*Rat anti TNF- α*) yang selanjutnya berikatan dengan antibodi sekunder (*Goat Anti Rat Biotin Labeled*), kemudian dilakukan penambahan *Strep Avidin Horse Radish Peroxidase* (SA-HRP) dan substrat *Diamino Benzidine* (DAB) sehingga terbentuk warna coklat pada TNF- α (Falangola *et al.*, 2015).



Gambar 5.2 Ekspresi TNF- α dengan pewarnaan imunohistokimia pada bagian dermis luka insisi tikus model diabetes (Pebersaran mikroskop 400x). Keterangan: (A) kontrol negatif. (B) kontrol positif. (C) terapi oral *effervescent* kulit jeruk manis 500 mg/kg BB. (D) terapi salep ekstrak kulit jeruk manis konsentrasi 5%. (E) terapi kombinasi oral dan salep. Tanda () menunjukkan ekspresi TNF- α

Luka insisi pada jaringan kulit akan menyebabkan terjadinya kerusakan jaringan maupun terputusnya pembuluh darah. Mekanisme

penghentian darah atau hemostasis terdiri dari tiga langkah utama, yaitu *spasme vascular*, pembentukan sumbat trombosit dan koagulasi darah. Selain terjadi hemostasis, kerusakan jaringan akan menyebabkan makrofag memproduksi ROS (*Reactive Oxygen Species*), *Growth Factor* serta sitokin pro-inflamasi *Tumor Necrosis Factor- α* (TNF- α). *Tumor Necrosis Factor- α* (TNF- α) merupakan salah satu sitokin yang memiliki sifat pro-inflamasi, berperan penting dalam *innate* dan adaptif, proliferasi sel, maupun proses apoptosis. Peningkatan TNF- α akan menyebabkan stress oksidatif, menyebabkan inflamasi berlebih maupun kerusakan organ (Naiya *et al.*, 2009). Terapi ekstrak kulit jeruk manis yang mengandung flavonoid sebagai antioksidan dapat berfungsi menekan inflamasi.

Pengamatan ekspresi TNF- α pada penelitian ini dilakukan dengan menganalisis masing-masing ulangan dengan penilaian pada 5 lapang bidang pandang dengan perbesaran 400x antar kelompok perlakuan. Hasil ekspresi TNF- α yang diperoleh dikonversikan ke dalam presentase (%) dan diproses menggunakan *software ImmunoRatio*, kemudian dilakukan analisis statistika menggunakan *One Way ANOVA* dengan menggunakan *software IBM SPSS Statistic 23*. Berdasarkan statistika deskriptif, semua kelompok perlakuan menunjukkan nilai standar deviasi yang lebih kecil dari *mean*. Uji yang dilakukan selanjutnya adalah uji homogenitas dan uji normalitas untuk mengetahui apakah data tersebut tergolong homogen dan normal. Berdasarkan kedua uji tersebut, data tersebut tergolong homogen dan normal sehingga dapat dilanjutkan ke uji *One Way ANOVA*. Pada uji *one way*

ANOVA didapat hasil nilai Sig. <0,05 yang menunjukkan H0 ditolak sehingga terdapat minimal satu kelompok yang memiliki perbedaan rata-rata yang signifikan. Setelah itu dilakukan uji beda nyata jujur (BNJ) untuk mengetahui kelompok yang memiliki perbedaan rata-rata signifikan. Hasil dari uji BNJ tersebut disajikan pada **tabel 5.1**.

Tabel 5.1 Rata-rata Hasil Uji BNJ Ekspresi TNF- α pada Kelompok Tikus Perlakuan

Kelompok	Ekspresi TNF- α	Ekspresi TNF- α	
	Rata-rata (ekspresi) \pm SD	Peningkatan terhadap K- %	Penurunan Terhadap K+ %
1 (Kontrol negatif)	33,65 \pm 6,9 ^b	-	-
2 (Kontrol positif)	43,92 \pm 3,9 ^c	30,5%	-
3 (Terapi Oral)	31,60 \pm 1,1 ^b	-	25,77%
4 (Terapi Salep)	29,72 \pm 0,5 ^{ab}	-	32,33%
5 (Terapi Kombinasi)	23,25 \pm 1,9 ^a	-	47,06%

Keterangan: Perbedaan notasi a, b, c menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$) antara kelompok perlakuan

Hasil analisis statistika menunjukkan bahwa pemberian terapi ekstrak kulit jeruk manis (*Citrus sinensis*) secara oral, topikal, maupun kombinasi pada luka insisi tikus model diabetes mellitus menyebabkan penurunan ekspresi TNF- α secara signifikan ($p < 0,05$). Perlakuan insisi pada tikus kelompok negatif menunjukkan ekspresi TNF- α dengan rata-rata 33,65 \pm 6,9%. TNF- α merupakan salah satu faktor angiogenesis yang bekerja secara tidak langsung yang dihasilkan oleh makrofag, sel endotel, atau sel tumor. TNF- α memiliki mekanisme stimulasi angiogenesis yang diawali dengan mobilisasi makrofag menuju area luka dan mensekresikan TNF- α sebagai faktor kemotaktik sel endotel pembuluh darah. Aktivasi TNF- α ini kemudian

menyebabkan terjadinya pelepasan mitogen sel endotel yang dapat disimpan di dalam ECM (*extracellularmatrix*) untuk pertumbuhan sel endotel (Polverini, 2002).

Ekspresi TNF- α tikus kontrol positif mengalami peningkatan 30,5% dengan rata-rata ekspresi sebanyak $43,92 \pm 3,9\%$ dan menunjukkan perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$) terhadap kelompok kontrol negatif. Peningkatan TNF- α dikarenakan kondisi jaringan yang mengalami luka akibat insisi dalam keadaan hiperglikemia. Hiperglikemia melalui jalur AGE (*Advanced Glycosylation end Product*), Poliol, dan aktivasi protein Kinase C mempercepat pembentukan ROS (*Reactive Oxygen Species*) (Wiyono, 2003). Tingginya kadar ROS secara berkepanjangan akan mengaktivasi dan mempertahankan kaskade asam kardionat yang akan memicu ulang timbulnya berbagai mediator inflamasi seperti prostaglandin dan leukotriene. Mediator inflamasi tersebut memiliki efek kemotaktik terhadap makrofag yang akan menuju ke area inflamasi dan mengeluarkan beberapa sitokin proinflamasi, salah satunya TNF- α . TNF- α merupakan sitokin utama pada respon inflamasi akut yang memiliki efek antara lain pengerahan neutrofil dan monosit ke tempat infeksi serta mengaktifkan sel-sel tersebut untuk menyingkirkan mikroba dan memacu ekspresi molekul adhesi sel endotel vascular terhadap leukosit. TNF- α dalam jumlah yang lebih besar akan berdampak pada kelainan patologi *shock septic* (Baratawidjaja, 2006).

Ekspresi TNF- α pada kelompok terapi oral menunjukkan penurunan sebesar 25,77% dengan rata-rata ekspresi sebanyak $31,60 \pm 1,1\%$ dan

menunjukkan perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$) terhadap kelompok kontrol positif. Penurunan ini dikarenakan terapi oral effervescent kulit jeruk manis dapat mencegah interaksi AGE dengan protein sehingga mencegah produksi sitokin proinflamasi secara terus-menerus. Kandungan vitamin C pada ekstrak kulit jeruk manis dapat berkompetisi dengan glukosa dalam ikatannya dengan protein sehingga menekan pembentukan AGE dan gangguan kesembuhan luka dapat dicegah. Selain manfaat terhadap kesembuhan luka, terapi secara oral juga berdampak secara sistemik. Kandungan vitamin dan flavonoid dari kulit jeruk manis mampu menurunkan hiperglikemia pada tikus DM (Ahmad, *et al.*, 2013). Flavonoid kulit jeruk manis dapat meregenerasi sel β pankreas sehingga hormon insulin dapat diproduksi kembali dan kadar gula darah dapat dikontrol sehingga mencegah gangguan kesembuhan luka terbentuk (Muhtadi, dkk., 2013). Flavonoid secara umum juga memiliki manfaat untuk menekan proses inflamasi (Felipe, *et al.*, 2015). Kondisi diabetes mellitus menyebabkan luka insisi mengalami proses inflamasi yang lebih lama. Kandungan flavonoid dalam kulit jeruk manis dapat berfungsi untuk menurunkan ekspresi TNF- α sebagai salah satu sitokin proinflamasi, namun pemberian secara oral memerlukan proses metabolisme sehingga tidak dapat bekerja secara langsung pada area luka.

Eksresi TNF- α pada kelompok terapi salep menunjukkan penurunan sebesar 32,33% dengan rata-rata ekspresi sebanyak $29,72 \pm 0,5\%$ dan menunjukkan perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$) terhadap kelompok kontrol positif. Penurunan ini terjadi karena kandungan flavonoid pada kulit jeruk

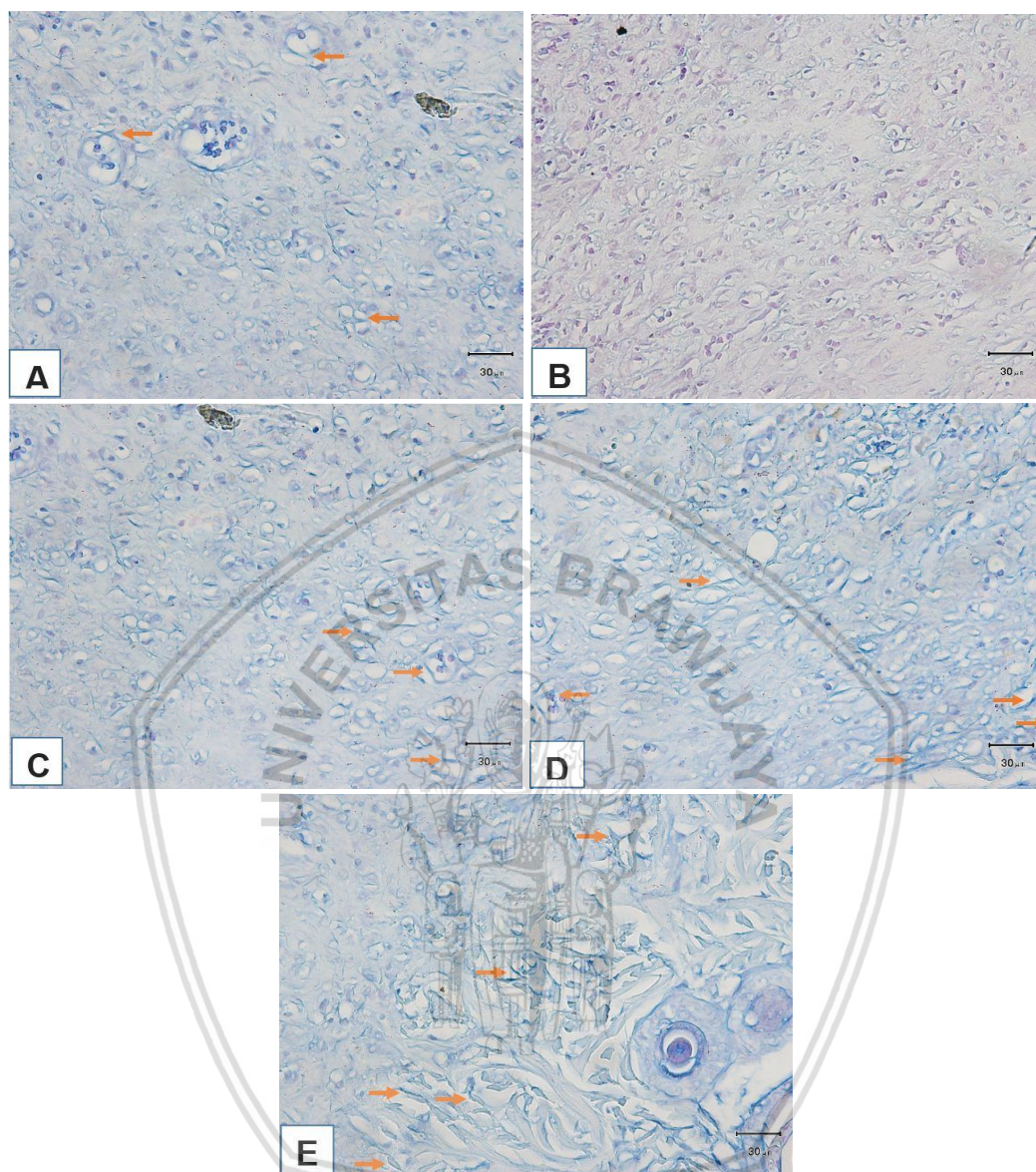
manis yaitu hesperidin yang bersifat antiinflamasi (Ramasany dan Bhaskar, 2005). Kemampuan flavonoid sebagai antiinflamasi membuat fase inflamasi pada luka menjadi lebih singkat. Flavonoid yang terkandung dalam kulit jeruk menghambat inflamasi yang terjadi dengan cara menghambat enzim siklooksigenase (COX) dan enzim lipooksigenase pada saat metabolisme asam arakhidonat sehingga menghambat mediator inflamasi, salah satunya TNF- α sebagai sitokin pro-inflamasi. Terhambatnya TNF- α mampu menurunkan reaksi inflamasi dan penyembuhan luka bergerak menuju proliferasi (Kartikaningtyas, dkk., 2015). Ekspresi TNF- α pada kelompok terapi salep lebih banyak mengalami penurunan apabila dibanding kelompok terapi oral. Salep sebagai obat topikal bekerja dengan cara masuk ke dalam permukaan kulit mengikuti suatu gradien konsentrasi (difusi pasif) (Sharma, 2015). Kandungan zat aktif dalam salep ekstrak kulit jeruk manis dapat berdifusi dalam jaringan kulit sehingga dapat memberikan efek terapi secara langsung pada area luka.

Ekspresi TNF- α pada kelompok terapi kombinasi oral dan topikal menunjukkan penurunan sebesar 47,06% dengan rata-rata ekspresi sebanyak $23,25 \pm 1,9\%$ dan menunjukkan perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$) terhadap kelompok kontrol positif. Penurunan ekspresi TNF- α lebih banyak terjadi pada terapi kombinasi dibanding terapi oral atau topikal. Hal ini terjadi karena pemberian secara oral dari ekstrak kulit jeruk manis memiliki kandungan vitamin C dan flavonoid yang mampu menurunkan hiperglikemia dan inflamasi sistemik pada tikus DM, serta pemberian secara topikal dari

salep ekstrak kulit jeruk manis yang memiliki efek antiinflamasi yang dapat langsung bekerja pada area luka (Ahmad, *et al.*, 2013; Ramasany dan Bhaskar, 2005). Kombinasi terapi ini memiliki efek sinergis yang dapat menurunkan ekspresi TNF- α dan mempercepat fase inflamasi sehingga proses kesembuhan luka dapat dilanjutkan ke fase proliferasi.

5.2 Pengaruh Pemberian Ekstrak Kulit Jeruk Manis terhadap Kepadatan Kolagen pada Penyembuhan Luka Insisi Tikus Model Diabetes

Indikator keberhasilan pemberian terapi ekstrak kulit jeruk pada luka luka insisi tikus model diabetes mellitus selain diamati dari penurunan ekspresi TNF- α juga dapat diketahui melalui pengamatan histopatologi kepadatan kolagen dengan pewarnaan *Masson's Trichrome*. Kolagen merupakan protein utama yang menyusun komponen matrix ekstraseluler dan merupakan protein terbanyak yang ditemukan dalam tubuh. Pada deposisi matrik ekstraseluler, sintesis kolagen diperbanyak oleh factor pertumbuhan dan sitokin yaitu PDGF, FGF, TGF- β , dan TNF- α . Pewarnaan *Masson's Trichrome* merupakan pewarnaan khusus untuk serabut jaringan ikat seperti kolagen. Kolagen dalam pewarnaan *Masson's Trichrome* akan tampak berwarna biru.



Gambar 5.3 Gambaran histopatologi kolagen dengan pewarnaan Masson's Trichrome pada bagian dermis luka insisi tikus model diabetes (Pebersaran mikroskop 400x).

Keterangan: (A) kontrol negatif. (B) kontrol positif. (C) terapi oral *effervescent* kulit jeruk manis 500 mg/kg BB. (D) terapi salep ekstrak kulit jeruk manis konsentrasi 5%. (E) terapi kombinasi oral dan salep. Tanda (→) menunjukkan serabut kolagen

Pada kelompok kontrol negatif (**Gambar 5.3 A**) terlihat sedikit serabut kolagen tipis berwarna biru pada area luka insisi. Hal ini menandakan pada kelompok kontrol negatif sudah mulai terjadi peralihan fase inflamasi ke

proliferasi, namun masih sedikit sekali terjadi sintesis kolagen. Pada kelompok kontrol positif (**Gambar 5.3 B**) terlihat belum terbentuknya serabut kolagen yang ditandai dengan tidak adanya serabut berwarna biru pada preparat. Terlihat hasil bahwa jaringan dominan berwarna merah muda yang menandakan sangat sedikitnya jaringan ikat yang terbentuk pada area luka insisi. Hal ini menunjukkan tikus pada kelompok kontrol positif memiliki fase inflamasi yang diperpanjang sehingga belum terlihat tanda-tanda pembentukan serabut kolagen. Menurut Ahmat *et al.* (2013) meningkatnya ROS secara sistemik pada penderita diabetes akan menyebabkan produksi inflamasi dikeluarkan secara terus menerus sehingga dalam keadaan luka fase inflamasi akan berlangsung lebih lama. Proses inflamasi yang berkepanjangan dapat menghambat sintesis jaringan kolagen sehingga menyebabkan lamanya proses penyembuhan luka (Ashari, 2013).

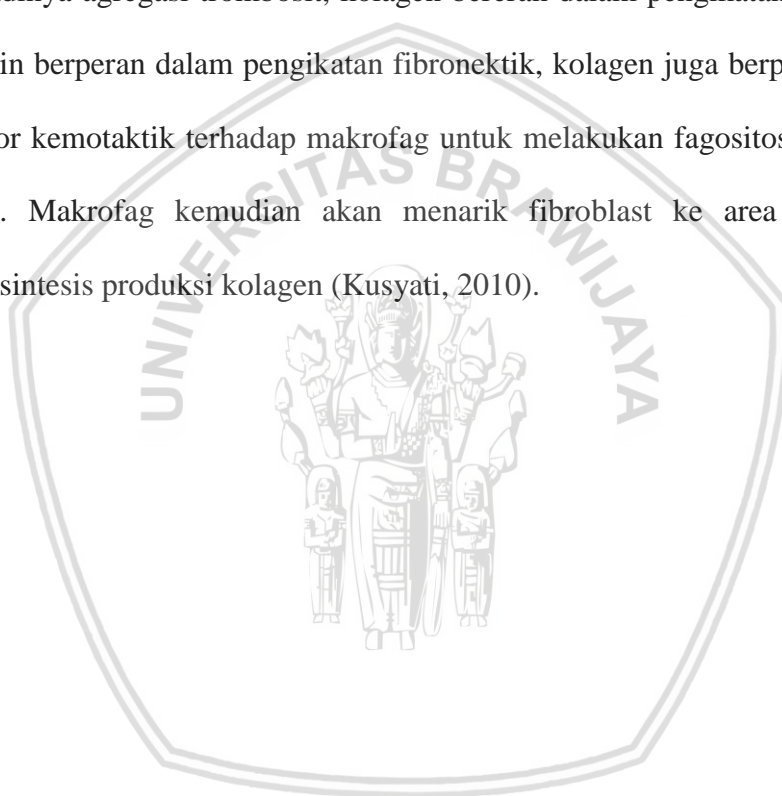
Pada kelompok terapi oral (**Gambar 5.3 C**) terlihat gambaran histopatologi yang hampir sama dengan kelompok kontrol negatif. Terlihat mulai terjadi sintesis kolagen dengan ditandai adanya beberapa serabut kolagen tipis berwarna biru. Hal ini dikarenakan pemberian effervescent ekstrak kulit jeruk manis secara oral dapat membantu mengurangi kondisi hiperglikemia. Flavonoid dalam kulit jeruk manis dapat mencegah pembentukan ROS sehingga mediator inflamasi seperti prostaglandin dan leukotriene dapat dihambat (Muhtadi *et al.*, 2015). Kondisi ini dapat membantu mempercepat fase inflamasi untuk berlanjut ke fase proliferasi dimana sintesis kolagen mulai terjadi.

Pada kelompok terapi salep (**Gambar 5.3 D**) terlihat serabut kolagen tipis yang lebih banyak jumlahnya dibanding dengan terapi oral. Kulit jeruk manis mengandung flavonoid dan vitamin C (Etebu *and* Nwauzoma, 2014). Pemberian salep kulit jeruk manis secara topikal akan memberikan efek zat aktif tersebut langsung ke area luka insisi. Kandungan flavonoid pada kulit jeruk manis yaitu hesperidin dapat bersifat antiinflamasi. Kemampuan flavonoid sebagai antiinflamasi membuat fase inflamasi pada luka menjadi lebih singkat (Ramasany dan Bhaskar, 2005). Kandungan vitamin C dalam salep kulit jeruk manis juga berperan penting sebagai *growth factor* yang berkontribusi dalam penyembuhan luka dengan cara menstimulasi sintesis fibroblas untuk memproduksi kolagen lebih banyak (Putra dkk., 2010). Vitamin C merupakan komponen penting yang diperlukan untuk proses hidrosilasi prolin dan lisin menjadi prokolagen yang penting untuk sintesis kolagen. Oksidasi vitamin C dengan kofaktor Fe^{2+} menyebabkan pengeluaran energi dalam bentuk anion radikal oksigen superoksida O_2^- yang akan membantu peningkatan sintesis kolagen.

Pada kelompok terapi kombinasi oral dan topikal (**Gambar 5.3 E**) menunjukkan sintesis kolagen yang paling baik. Terlihat terdapat banyak serabut kolagen berwarna biru yang terbentuk pada area luka insisi. Hal ini terjadi karena kombinasi pemberian terapi secara peroral dapat membantu mengurangi inflamasi secara sistemik dan pemberian secara topikal dapat memberikan efek antiinflamasi secara langsung pada area luka sehingga

menimbulkan efek sinergis untuk membantu proses sintesis kolagen sehingga mempercepat proses kesembuhan luka.

Penyembuhan luka adalah proses kompleks yang ditandai dengan adanya proses hemostatis atau penghentian perdarahan. Trombosis dan faktor pembekuan merupakan faktor hemostatik intravaskuler yang utama. Pada saat terjadinya agregasi trombosit, kolagen berperan dalam pengikatan fibronectin. Selain berperan dalam pengikatan fibronectin, kolagen juga berperan sebagai faktor kemotaktik terhadap makrofag untuk melakukan fagositosis pada area luka. Makrofag kemudian akan menarik fibroblast ke area luka untuk mensintesis produksi kolagen (Kusyati, 2010).



BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dan pembahasan yang telah dilakukan, maka dapat disimpulkan bahwa efek terapi pemberian ekstrak kulit jeruk manis (*Citrus sinensis*) pada luka insisi tikus model diabetes adalah sebagai berikut:

1. Pemberian terapi ekstrak kulit jeruk manis secara oral dan topikal pada luka insisi tikus model diabetes dapat menurunkan ekspresi TNF- α dengan penurunan hingga 47,06% terhadap kontrol positif.
2. Pemberian terapi ekstrak kulit jeruk manis secara oral dan topikal pada luka insisi tikus model diabetes dapat membantu proses sintesis kolagen dengan pemberian terapi kombinasi salep dan *effervescent* yang memiliki efek paling signifikan.

6.2 Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai perbandingan kesembuhan luka insisi tikus model diabetes menggunakan obat-obatan konvensional yang ada di masyarakat dengan salep dan *effervescent* ekstrak kulit jeruk manis.

DAFTAR PUSTAKA

- Abbas, A. K., A.H. Lichtman, S. Pilai. 2010. *Cellular and Molecular Immunology Updated Edition 6*. Philadelphia: Saunders.
- Afriyanti, R., R. Yenti, H. Monica. 2014. Pengamatan Serabut Kolagen pada Proses Penyembuhan Luka dalam Sediaan Krim Ekstrak Etanol Daun Bandotan. *Prosiding Seminar Nasional dan Workshop "Perkembangan Terkini Sains Farmasi dan Klinik IV"*
- Ahmad, M., M.N. Ansari, A. Alam, T.H. Khan. Oral Dose of Citrus Peel Extract Promotes Wound Repair in Diabetic Rats. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 16 (20): 1086-1094
- Alizadeh, A.M. 2010. The Effect of Teucrium Polium Honey on the Wound Healing and Tensile Strength in Rat. *Iranian Journal of Basic Medical Science* 14(6): 499-505
- Ashari, Y. 2013. Pemberian Salep Ekstrak Daun Mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) terhadap Peningkatan Kepadatan Sabut Kolagen pada Mukosa Oral Mulut. [Skripsi]. Fakultas Kedokteran Gigi. Universitas Airlangga
- Aulanni'am, D.W. Soeatmadji, F. Fatchiyah, dan B.S. Sumitro. 2005. Detection of GAD 65 Auto Antibodies of Type 1 Diabetes Using GAD 65-abs Reagen Produce from Bovine Brain Tissue. *Medical Journal of Indonesia* 14:197-205.
- Baratawidjaja, K. 2006. *Imunologi Dasar Edisi 7*. Jakarta: Penerbit FK UI
- Carvalho, E. N. D., N. A. S. D. Carvalho, L.M. Ferreira. 2003. Experimental Model of Induction of Diabetes Mellitus in Rats. *Acta Cirurgica Brasileira* 18:60-64
- Cotran, R.S., V. Kumar, T. Collins. 2003. *Pathology Basic of Disease 6th Edition*. Philadelphia: Saunders Co.
- Dalimunthe, D. 2004. Diabetes Mellitus: Peranan Insulin, Reseptor Insulin dan Penanganannya. Pidato pengukuhan Jabatan Guru Besar Tetap Ilmu Gizi Fakultas Kedokteran Universitas Sumatera Utara: Medan 17 April 2004.
- Das, K. 2013. Wound Healing Potential of Aqueous Crude Extract of Stevia Rebaudiana in Mice. *Brazilian Journal of Pharmacology* 23(2): 351-357
- Ditjen Bina Farmasi dan Alkes. 2005. *Pharmaceutical Care untuk Penyakit Diabetes Mellitus*. Jakarta: Departemen Kesehatan RI

- Eroshenko, V.P. 2010. *Atlas Histologi di Firore: dengan Korelasi Fungsional Edisi 11*. Jakarta: EGC
- Etebu, E. and A.B. Nwauzoma. 2014. A Review on Sweet Orange: Health, Disease, and management. *American Journal of Research Communication* 2(2): 33-70
- Evania dan S. Rince. 2007. *MIMS Indonesia Petunjuk Konsultasi Edisi 7*. Jakarta: PT. Infomaster
- Falangola, M.F., S.P. Lee, R.A. Nixon, K. Duff, J.K. Helpen. 2005. Histological Co-Localization of Iron in Abeta Plaques of pS/APP Transgenic Mice. *Neurochemical Research*. 30(2): 201-2054
- Felipe, A.P., S.N.H Miriam and M.B. Sergio. 2015. Protective effects of the flavonoid hesperidin methyl chalcone in inflammation and pain in mice: role of TRPV1, oxidative stress, cytokines and NF- κ B. *Chemico-Biological Interactions*. 228: 88-99
- Fernandez, E., M.A. Martin, S. Fajardo, D. Bailbe. 2006. Undernutrition Does not Alter the Activation of Beta-cell Meogenesis and Replication in Adult Rats after Partial Pancreatectomy. *American Journal of Physiology-Endocrinology & Metabolism* 291(5): 13-21
- Flavell, S.J., T.Z. Hou, S. Lax, A.D. Filer, M. Salmon, C.D. Buckley. 2008. Fibroblast as Novel Therapeutic Targets in Chronic Inflammation. *Br.J.Pharmacology*: 153
- Gupta, P. 2002. *Recent Advances in Semisolid Dosage Forms for Dermatological Application*. Pharmaceutical Technology
- Gurtner, G.C. 2007. *Wound Healing, Normal and Abnormal: Grabb and Smith's Plastic Surgery 6th Edition*. P: 15-22
- Hendrich, H. J. 2006. *Taxonomy and stocks and strains in the Laboratory Rat*. Burlington : Elsevier Academic
- Hussain, H.E.M. 2002. Reverse of Diabetic Retinopathy in Streptozotocin Induced Diabetic Rats using Traditional Indian Anti Diabetic Plant Azadirachta Indica. *Indian Journal Clinical Biochemistry* 17:115-123
- International Diabetes Federation [IDF]. 2015. *IDF Diabetes Atlas 7th Edition*. Brussels: International Diabetes Federation
- Junquiera, L.C. and J. Carneiro. 2007. *Basic Histology*. The McGraw-Hill Companies

- Kaempe, H., E. Suryato, S. Kawengian. 2013. Potensi Ekstrak Fenolik Buah Pisang Goroho (*Musa Spp.*) Terhadap Gula Darah Tikus Putih. *Chem Prog* 6 (1): 6-10
- Kalangi, S.J.R. 2013. Histofisiologi Kulit. *Jurnal Biomedik* 5(3): 12-20
- Kardono, L.B.S., N. Artanti, T. Dewiyanti, K. Basuki, K. Padmawinata. 2003. *Selected Indonesian Medical Plant Monograph and Description*. Jakarta: PT. Gramedia Widia Sarana Indonesia
- Kartikaningtyas, A.T., Prayitno, S.P. Lastianny. 2015. Pengaruh Aplikasi Gel Ekstrak Kulit Citrus Sinensis terhadap Epitelisasi pada Penyembuhan Luka Gingiva Tikus Sprague Dawley. *Maj Ked Gi Ind* 1(1): 86-93
- Kusriningrum. 2008. *Dasar Perancangan Percobaan dan Rancangan Acak Lengkap*. Surabaya: Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga
- Kusyati, E. 2010. Pengaruh Suplementasi Vitamin C terhadap Jumlah Fibroblas disekitar Luka Insisi pada Tikus Usia Tua. [Tesis]. Magister Ilmu Biomedik Universitas Diponegoro Semarang.
- Lobmann, R., G. Schutz, H. Lehnert. Proteases and the Diabetic Foot Syndrome: Mechanisms and Therapeutic Implications. *Diabetes Care* 28(2): 461-471
- Lorentz, H.P. and Longaker. 2006. *Wound Healing: Repair Biology and Wound Scar Treatment in Mathes*. Philadelphia: Saunders Elsevier
- Milind, P. dan C. Dev. 2012. Orange: Range of Benefits. *International Research Journal of Pharmacy* 3(7): 59-63
- Mogensen, C. 2007. *Pharmacotherapy of Diabetes: New Developments*. New York: Springer Science, Business Media LLC.
- Muhtadi, Haryoto, T. Azizah, A. Suhendi, K.H. Yen. 2015. Antidiabetic and Antihypercholesterolemic Activities of Citrus sinensis Peel: in Vivo Study. *Physiol Pharm Pharmacol* 5(5): 382-385
- Naiya, T.K., P. Chowdhury, A.K. Bhattacharya, S.K. Das. 2009. Sawdust and Neem Bark as Low-cost Natural Biosorbent for Adsorptive Removal of Zn (II) and Cd (II) Ions from Aqueous Solutions. *Chemical Engineering Journal* 148: 68-79.
- Nelson, R. W. 2010. *Canine Diabetes Mellitus*. In: *Ettinger SJ, Feldmen EC, eds. Textbook of Veterinary Internal Medicine*. 7th ed. St. Louis, MO: Saunders
- Nugroho, A. E. 2006. Review Hewan Percobaan Diabetes Mellitus: Patologi dan Mekanisme Aksi Diabetogenetik. *Biodeversitas* 7 (4): 378-382

- Olayaki, I. A., A.O. Soladoye, T.M. Salman, and B. Joraiah. 2008. Effect of Photoperiod on Testicular Functions in Male Sprague-dawley Rats. *Nigerian Journal of Physiological Sciences*, 23(1-2): 27-30
- Pan J., J.T. Van, E. Chan, R.L. Kesala, M. Lin, M.A. Charles. 2002. Extended-Release Niacin Treatment of the Atherogenic Lipid Profile and Lipoprotein (A) in Diabetes. *Metabolism* 51: 1120-1127
- Popa, C., M.G. Netea, P.L.C.M Riel, J.W.M. der Meer, A.F.H. Stalenhoef. 2007. The Role of TNF- α in Chronic Inflammatory Conditions, Intermediary Metabolism, and Cardiovascular Risk. *J.Lipid Res* 48: 751-762
- Pracaya. 2000. *Jeruk Manis, Varietas, Budidaya dan Pascapanen*. Jakarta: Swadaya
- Purwaningtyas B. 2016. *Pengaruh Ekstrak Kacang Tunggak (Vigna unguiculata) Terhadap Penurunan Kadar Maondialdehyde, Diameter Duktus dan Tebal Epitel Duktus Kelenjar Payudara Rattus norvegicus Ovariectomi*. [Tesis]. Program Studi Magister Kebidanan. Universitas Brawijaya.
- Puspitasari, H.A., H.B.A Ummah, dan S.S Tri. 2011. Faktor-faktor yang Mempengaruhi Penyembuhan Luka Post Operasi Sectio Caesarea (SC). *Jurnal Ilmiah Kesehatan Keperawatan* 7(1)
- Putra, A.T., A. Wiwit, M.Y. Hamidy. 2010. Tingkat Kepadatan Fibroblas pada Luka Sayat Mencit dengan Pemberian Gel Lidah Buaya. Fakultas Kedokteran Universitas Riau. Pekanbaru.
- Qi, S. 2005. Production of 2-(2-Phenylethyl) Cromones in Cell Suspension Cultures of Aquilaria Sinensis. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 83: 217-221.
- Rahma, K., Aulanni'am, dan M. Chanif. 2014. Pengaruh Pengobatan Herbal Spray Berbasis Bioaktif dari Spirulina (*Spirulina sp.*) Terhadap Profil Protein Luka dan Histologi Pankreas Tikus Terpapar Multiple Low Dose Streptozotocin. *Kimia Student Journal* 1 (1): 71-77
- Ramasany, S.S., and A. Bhaskar. 2016. Evaluation of the Wound-healing Potency of Citrus sinensis in Wistar Rats. *Der Pharmacia Lettre* 8(1): 161-168
- Ress, D.A. and J.C. Alcolado. 2005. Animal Models of Diabetes Mellitus. *Diabetic Medicine* 22: 359-370
- Reusch, C. 2010. *Feline Diabetes Mellitus*. In: *Ettinger SJ, Feldmen EC, eds. Textbook of Veterinary Internal Medicine*. 7th ed. St. Louis, MO: Saunders
- Sabiston, C.D. 2000. *Wound Healing: Biologic and Clinical Features*. 15th edition. Philadelphia: WB Saunders Comp.

- Sanjoyo, R. 2005. *Obat (Biomedik Farmakologi)*. Yogyakarta: UGM Press
- Schaefer, H., T.E. Redelmeier, G.J. Nohynek, J. Lademann. 2008. *Pharmacokinetics and Topical Application of Drugs*. New York: McGraw Hill
- Sharma, S. 2015. Topical Drug Delivery Systems: A Review. <<http://www.pharmainfo.net>> [10 Juli 2017]
- Sodera, V.K. dan M. Saleh. 2000. *Ilustrasi Ilmu Bedah Minor*. Jakarta: Bina Rupa Aksara
- Sukmadadari, A.E., R. Ratnawati, T. E. Hernowati. 2012. Pengaruh Ekstrak Metanol Daun Kelor (*Moringa oleifera*) terhadap Ekspresi TNF- α pada Jaringan Hepar Tikus Wistar yang diinduksi DMBA [Skrpisi]. Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.
- Suriadi. 2004. *Fisiologi Penyembuhan Luka & Faktor yang Mempengaruhi Penyembuhan Luka Dalam: Perawatan Luka Edisi 1*. Jakarta: Sagung Seto
- Szkudelski, T. 2001. The Mechanism of Alloxan and Streptozotocin Action in β Cell of the Rat Pancreas. *Physiology Research* 50: 536-554
- Tanenberg, R.J. Duloxetine, Pregabalin, and Duloxetine Plus Gabapentin for Diabetic Peripheral Neuropathic Pain Management in Patients with Inadequate Pain Response to Gabapentin. *Mayo Clin Proc* 86(7): 615-626
- Wyatt, E.L., S.H. Sutter, L.A. Drake. 2001. *Dermatological Pharmacology; the pharmacological basis of therapeutics*. New York: McGraw-Hill